

ELÄINLÄÄKETIETEEN LISENSIAATIN TUTKIELMA
ail-GEENIN MONIMUOTOISUUS *YERSINIA*-KANNOISSA

Veera-Kaisa Karhapää

Ohjaaja Suvi Joutsen

Työn johtaja Maria Fredriksson-Ahomaa

Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2016



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning - Department Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto
Tekijä - Författare - Author Veera-Kaisa Karhapää		
Työn nimi - Arbetets titel - Title <i>ail</i> -geenin monimuotoisuus <i>Yersinia</i> -kannoissa		
Oppiaine - Läroämne - Subject Lihantarkastuksen ja teurastamohygienian oppiaine		
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year Kevät 2017	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 59
<p>Tiivistelmä - Referat - Abstract</p> <p><i>Yersinia enterocolitica</i> on merkittävä bakteeriperäisen suolistotulehduksen aiheuttaja Suomessa. <i>Y. enterocolitica</i> esiintyy kuutta eri biotyyppiä (1A, 1B, 2 - 5), joista biotyyppiä 1A pidetään ei-patogeenisena. Biotyypiltä 1A puuttuvat virulenssiplasmidi pYV ja merkittävät kromosomaaliset virulenssigeenit kuten <i>inv</i> ja <i>ail</i>. <i>Y. enterocolitica</i> biotyypin 1A kantoja eristetään kuitenkin säännöllisesti suolistotulehduksen oireista kärsiviltä potilailta. Biotyypin 1A kantojen on myös satunnaisesti havaittu kantavan <i>ail</i>-geeniä. <i>Yersinia kristensenii</i> on ei-patogeenisena pidetty ympäristölaji, jonka ei myöskään kuuluisi kantaa <i>ail</i>-geeniä.</p> <p><i>Y. enterocolitica</i> biotyypin 1A kantojen <i>ail</i>-geenejä on aiemmin sekvensoitu vain muutamia ja näiden kantojen <i>ail</i>-geeneissä on ollut vain pieniä eroja patogeenisten kantojen <i>ail</i>-geeneihin verrattuna. Tämän tutkimuksen tavoitteena on tutkia ei-patogeenisten <i>ail</i>-positiivisiksi todettujen <i>Y. enterocolitica</i> 1A- ja <i>Y. kristensenii</i> -kantojen <i>ail</i>-geenejä. Olettamuksena oli, että tutkittujen <i>Y. enterocolitica</i> 1A -kantojen <i>ail</i>-geenien sekvenssit ovat lähes identtisiä, mutta että eroja löytyy verrattuna patogeenisten kantojen <i>ail</i>-geeneihin. <i>Y. kristensenii</i> ja <i>Y. enterocolitica</i> patogeenisten kantojen <i>ail</i>-geenien välillä odotettiin löytyvän selkeitä eroja.</p> <p>Tutkimuksessa tutkittiin 26 jo aiemmin reaaliaikaisella PCR:llä <i>ail</i>-positiiviseksi todettua kantaa, jotka oli eristetty useasta eri lähteestä: lampaasta, villisiasta, kanasta, luonnonvaraisista linnuista, ihmisestä, siasta, salaattisekoituksesta, jyrssiöistä, peurasta ja hirvestä. Kannat tunnistettiin bio- ja serotyyppityksen avulla. Kannoista 22 oli <i>Y. enterocolitica</i> biotyyppiä 1A ja neljä ympäristölajia <i>Y. kristensenii</i>. Kannoista eristettiin DNA, jota monistettiin <i>ail</i>-geenille spesifisillä alukkeilla. Kannoista 21 lähetettiin sekvensoitavaksi Helsingin yliopiston Biotekniikan instituuttiin.</p> <p>Tutkimuksen kantojen <i>ail</i>-geenien sekvenssejä verrattiin toisiinsa ja tietokannasta (NCBI) valittuihin referenssikantoihin 486 emäsparin pituiselta alueelta. Tutkimuksen kannat jakautuivat <i>ail</i>-geenin sekvenssin perusteella kahteen profiiliin. Profiilit erosivat toisistaan kahden eri kohdassa olevan emäksen verran. Profiilit olivat hyvin samanlaisia Saksassa eristetyin <i>Y. enterocolitica</i> biotyypin 1A kannan <i>ail</i>-geenin kanssa (99,6 – 100 %). Profiilit vastasivat myös melko hyvin korkeapatogeenisen biotyypin 1B kantaan 8081 (99,0 – 99,4 %). Kiinassa eristetystä <i>Y. enterocolitica</i> biotyypin 1A kannasta ja biotyyppien 2 ja 4 kannoista profiilit erosivat selkeämmin (95,5 – 96,3 %).</p> <p><i>ail</i>-geeniä käytetään yleisesti kohdegeeninä PCR-tutkimuksissa erottamaan patogeenisia kantoja ei-patogeenisista. Niin tämä kuin aikaisemmatkin tutkimukset osoittavat, että <i>ail</i>-geeniä esiintyy satunnaisesti myös ei-patogeenisilla kannoilla. Näin ollen <i>ail</i>-geeniin perustuva patogeenisten kantojen havaitseminen saattaa antaa virheellisiä positiivisia tuloksia.</p> <p>Ei-patogeenisten kantojen <i>ail</i>-geeneistä tarvitaan lisää tutkimusta. Kannoilta tulisi tutkia myös muita virulenssitekijöitä. Olisi myös syytä selvittää onko ei-patogeenisten kantojen <i>ail</i>-geeni toimiva. Kokogenomisekvensointia kyseisille kannoille voitaisiin harkita, jotta myös <i>ail</i>-geenin ympärillä olevat alueet saataisiin sekvensoitua.</p>		
Avainsanat - Nyckelord - Keywords <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia kristensenii</i> , biotyyppi 1A, <i>ail</i> -geeni		
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto		
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Työn johtaja Maria Fredriksson-Ahomaa Työn ohjaaja Suvi Joutsen		

SISÄLLYS

1. JOHDANTO

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Yersinia*-suku

2.1.1 Patogeeniset lajit

2.1.2 Ympäristölajit

2.2. Taudinaiheuttamiskyky

2.2.1. Kromosomaaliset tekijät

2.2.2. Plasmidivälitteiset tekijät

2.3. *ail*-geeni

2.3.1. Ail-proteiinin rakenne

2.3.2. Merkitys

2.4. DNA:n monimuotoisuuden tutkiminen

2.4.1. DNA:n eristys

2.4.2. PCR

2.4.3. Sekvensointi

3. TYÖN TAVOITTEET JA HYPOTEESI

4. MATERIAALI JA MENETELMÄT

4.1 Tutkimuksessa käytetyt kannat

4.2. Kantojen kuvaus

4.2.1. Kasvu selektiivialustoilla

4.2.2. Biotyypitys

4.3. DNA:n eristys

4.4. *ail*-geenin monistaminen

4.4.1. PCR-ohjelman optimointi

4.4.2. PCR reagenssit

4.4.3. Alukkeet

4.4.4. PCR-ajoliuos

4.5. PCR-tuotteen laadun varmistaminen

4.5.1 Geelielektroforeesi

4.5.2 DNA:n pitoisuus ja puhtaus

4.6. Sekvensointi

4.7. Sekvensointitulosten analysointi

5. TULOKSET

5.1 Kasvu selektiivialustoilla

5.2. Biotyypityksen tulokset

5.3. Sekvensointitulokset

6. POHDINTA

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

8. KIITOKSET

9. LÄHTEET

LIITTEET

1. JOHDANTO

Yersinia ovat gramnegatiivisia, fakultatiivisesti anaerobeja sauvabakteereja. *Yersinia*-lajeja tunnetaan tällä hetkellä 18, joista ihmisille patogeenisia on kolme; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* ja *Yersinia pestis*. *Y. pestis* aiheuttaa paiseruttoa, joka on ollut kaikista bakteereiden aiheuttamista taudeista ihmiskunnalle tuhoisin. Elintarvikkeiden ja veden välityksellä leviävät *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttavat yersinioosiksi kutsuttua suolistotulehdusta, joka on kolmanneksi yleisin bakteerin aiheuttama suolistotulehdus Suomessa. Yersinioosi saattaa levitä myös systeemiseksi infektioksi ja aiheuttaa jälkitauteina reaktiivista artriittia ja kyhmyruusua.

Y. enterocolitica jaetaan kuuteen eri biotyyppiin, joista biotyypit 1B, 2, 3, 4 ja 5 ovat ihmiselle patogeenisia. Biotyyppiä 1A pidetään ei-patogeenisena, koska siltä puuttuvat patogeenisille kannoille tyypilliset virulenssitekijät. Kuitenkin biotyyppiä 1A on eristetty suolistotulehduksen oireista kärsiviltä potilailta. Myös ei-patogeenisia ympäristölajeja kuten *Yersinia kristensenii* on eristetty satunnaisesti suolistotulehduksen yhteydessä.

Patogeenisuuteen liitetty *ail*-geeni koodaa *Yersinia*oilla bakteerin ulkokalvon Ail-proteiinia. *ail*-geenin on osoitettu antavan bakteerille monia patogeenisuuteen liittyviä ominaisuuksia. *ail*-geenin on ajateltu löytyvän vain patogeenisilta kannoilta, minkä takia sitä käytetään yleisesti kohdegeeninä erotettaessa patogeenisia ja ei-patogeenisia kantoja toisistaan PCR-menetelmän avulla. *ail*-geeniä on kuitenkin havaittu myös ei-patogeenisilla kannoilla kuten *Y. enterocolitica* biotyypillä 1A ja *Y. kristensenii*llä.

Tutkielman tarkoitus oli sekvensoida ja vertailla *ail*-positiivisiksi todettujen ei-patogeenisten *Yersinia*-kantojen *ail*-geenejä keskenään ja verrata niitä myös aiemmin sekvensoituihin *ail*-geeneihin. Tutkielman tavoitteena oli tuoda uutta tietoa *ail*-geenistä ja ei-patogeenisten kantojen mahdollisesta taudinaiheuttamiskyvystä. Ei-patogeenisten kantojen *ail*-geenejä on yleisesti tutkittu melko vähän. Tämä tutkimus on aiempiin tutkimuksiin verrattuna materiaaaliltaan laajempi. Aiemmissa tutkimuksissa sekvensoiduissa ei-patogeenisten kantojen *ail*-geeneissä on ollut pieniä eroja verrattuna patogeenisten kantojen *ail*-geeneihin. Olettamuksena oli, että myös tämän tutkimuksen kantojen *ail*-geenit eroavat patogeenisten kantojen *ail*-geeneistä.

2. KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1. *Yersinia*-suku

Yersinia-suku kuuluu Enterobacteriaceae-heimoon. *Yersinioiden* lisäksi muun muassa *Salmonella*-, *Escherichia*- ja *Klebsiella*-suvut kuuluvat Enterobacteriaceae-heimoon. Heimon jäsenet ovat gramnegatiivisia sauvabakteereja. Ne ovat fakultatiivisesti anaerobeja, mikä tarkoittaa, että ne voivat kasvaa sekä hapettomissa että hapellisissa olosuhteissa. Heimon jäsenet ovat usein liikkuvia, oksidaasinegatiivisia ja katalaasiposiivisia. Osa Enterobacteriaceae-heimoon kuuluvista bakteereista elää muualla kuin nisäkkäiden ruoansulatuskanavassa, mikä pätee myös moniin *Yersinia*-lajeihin (kirjassa Francino ym. 2006).

Yersinia-lajeja tunnetaan tällä hetkellä 18: *Yersinia aldovae*, *Yersinia aleksicae*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia entomophaga*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia massiliensis*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia nurmii*, *Yersinia pekkanenii*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia rohdei*, *Yersinia ruckeri*, *Yersinia similis* ja viimeisimmäksi löytynyt *Yersinia wautersii* (Le Guern ym. 2016).

Yersinia-lajeista suurin osa on harmittomia ympäristölajeja. Ihmisille patogeenisia lajeja on vain kolme: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. pestis* (Mikula ym. 2013). Lisäksi *Y. ruckeri* on patogeeninen useille kalalajeille (Calvez ym. 2014).

2.1.1. Patogeeniset lajit

Yersinia pestis

Yersinia pestis aiheuttaa paiseruttoa, josta käytetään myös nimitystä musta surma. Jyrsijät ja luonnonvaraiset nisäkkäät toimivat *Y. pestiksen* reservuaarina. Ihmiseen *Y. pestis* tarttuu yleisimmin kirpun pureman välityksellä ja infektiota on hoitamattomana usein kuolemaan johtava. Euroopassa on ollut ainakin kolme *Y. pestiksen* aiheuttamaa ruttopandemiaa, jotka ovat merkittävästi vaikuttaneet ihmispopulaatioon (Achtman ym. 1999). *Y. pestis* jaetaan

fenotyyppisten erojen perusteella kolmeen biotyyppiin, jotka ovat nimeltään Antiqua, Medievalis, ja Orientalis.

Y. pestiksen arvioidaan kehittyneen *Y. pseudotuberculosisesta* 1 500 – 20 000 vuotta sitten. *Y. pestiksen* ja *Y. pseudotuberculosisen* 16S rRNA sekvenssit ovat lähes identtiset (Trebesius ym. 1998, Ibrahim ym. 1993). Myös DNA-DNA hybridisaatio kertoo *Y. pestiksen* olevan läheistä sukua *Y. pseudotuberculosiselle* (Bercovier ym. 1980). Joidenkin tutkijoiden mielestä *Y. pestis* on eriytynyt niin vähän aikaa sitten *Y. pseudotuberculosisesta*, ja on niin samankaltainen sen kanssa, ettei sitä tulisi pitää omana lajinaan (Achtman ym. 1999). *Y. pestiksen* historiallisen tärkeyden ja sen aiheuttaman taudin vakavuuden takia yhteisen nimen käyttöä *Y. pseudotuberculosisen* kanssa vastustetaan (kirjassa Carniel ym. 2006). Huolimatta *Y. pestiksen* ja *Y. pseudotuberculosisen* samankaltaisuudesta, niiden tartuntatapa ja aiheuttama tauti eroavat toisistaan merkittävästi. *Y. pestis* leviää yleisimmin kirpunpureman välityksellä ja aiheuttaa paiseruttoa kun taas *Y. pseudotuberculosis* leviää veden ja elintarvikkeiden välityksellä, tarttuu feko-oraalisesti ja aiheuttaa suolistotulehdusta, joka harvoin on kuolemaan johtava (Achtman ym. 1999).

Yersinia pseudotuberculosis

Y. pseudotuberculosisista esiintyy pääsääntöisesti pohjoisella pallonpuoliskolla (Jalava ym. 2006). *Y. pseudotuberculosisen* lähteet ovat usein kasviperäisiä ja infektiot havaitaan yleensä silloin kuin tartunta on liittynyt joukkoruokailuun, jolloin sairastuneita on useampia. Japanissa vihannesmehua epäiltiin infektion lähteeksi, kun useita satoja oppilaita sairastui kouluruokailun yhteydessä (Inoue ym. 1984). Suomessa *Y. pseudotuberculosisista* on eristetty esimerkiksi raastetuista porkkanoista ja jäävuorisalaatista (Jalava ym. 2006, Nuorti ym. 2004). Vuonna 2014 *Y. pseudotuberculosisen* aiheuttama epidemia yhdistettiin yksittäiseltä tilalta peräisin olevaan raakamaitoon (Pärn ym. 2014).

Y. pseudotuberculosisista on eristetty myös useista eläinlajeista ja ympäristöstä. Luonnonvaraisista eläimistä *Y. pseudotuberculosisista* on eristetty esimerkiksi linnuista, jäniseläimistä, jyrsijöistä, apinoista, kaloista ja hirvieläimistä (Le Guern ym. 2016). Kotieläimistä *Y. pseudotuberculosisista* on tavattu muun muassa naudoissa, kissoissa, koirissa, vuohissa, lampaissa ja sioissa (Le Guern ym. 2016).

Y. pseudotuberculosis jaetaan lipopolysakkaridin O-antigeenin rakenteen perusteella viiteentoista eri serotyyppiin (O:1-O:15) ja kymmeneen alaryhmään (O:1a–c, O:2a–c, O:4a–b, O:5a–b) (Bogdanovich ym. 2003). Serotyyppinä O:1a ja O:1b eristetään eniten kliinisistä näytteistä Euroopassa, Pohjois-Amerikassa ja Australaasiassa (Australia, Oseania, Uusi Guinea, Uusi Seelanti) kun taas Itä-Aasiassa eniten eristetyt serotyypit ovat O:4b ja O:5b. Kaikki *Y. pseudotuberculosis* serotyypit ovat patogeenisia.

Yersinia enterocolitica

Y. enterocolitica on ainut *Yersinia*-laji, joka on jaettu kahteen alalajiin: *Y. enterocolitica* alalaji *enterocolitica* ja *Y. enterocolitica* alalaji *polarctica*. Jako perustuu alalajien 16S rRNA -geenin erilaisuuteen. *Y. enterocolitica* alalaji *enterocolitica* kattaa amerikkalaista alkuperää olevan biotyypin 1B, kun taas eurooppalaista alkuperää olevat biotyypit 1A ja 2-5 kuuluvat *Y. enterocolitica* alalaji *polarctica*an (Neubauer ym. 1999).

Y. enterocolitica on hyvin heterogeeninen laji. Siitä esiintyy kuutta eri biotyyppiä ja useita serotyyppinä. Biotyyppi 1B on korkeapatogeeninen ja biotyyppien 2, 3, 4 ja 5 patogeenisuus vaihtelee matalasta kohtalaiseen (Bhagat ja Viridi 2011). Biotyyppiä 1A pidetään ei-patogeenisena, koska siltä puuttuvat virulenssin aiheuttava plasmidi pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) ja tietyt kromosomaaliset tekijät, jotka patogeenisilla biotyypeilla on (Bhagat ja Viridi 2011).

Y. enterocolitica lipopolysakkaridin O-antigeeninä, joihin serotyypitys perustuu, on tunnistettu 30 erilaista ja myös flagellan H-antigeeninä *Y. enterocolitica* esiintyy useita (Bhagat ja Viridi 2011). Euroopassa yleisimmin esiintyvät bioserotyypit ovat 4/O:3 ja 2/O:9 (kirjassa Carniel ym. 2006).

Y. enterocolitica tarttuu *Y. pseudotuberculosis* tavoin feko-oraalisesti. Tartunta saadaan yleensä kontaminoituneen ravinnon mukana. Sianlihaa pidetään *Y. enterocolitica* yleisimpänä tartunnanlähteenä. *Y. enterocolitica* esiintyy erityisesti sian kielessä ja nielurisoissa, joten bakteerit voivat siirtyä lihaan teurastusprosessin aikana (kirjassa Carniel ym. 2006). Sika toimii *Y. enterocolitica* reservuaarina, joten sikoja tai raakaa sianlihaa

käsittelevät ihmiset, esimerkiksi tilalliset ja teurastajat ovat alttiita tartunnalle (kirjassa Carniel ym. 2006). *Y. enterocoliticaa* on eristetty myös raakamaidosta, joten raakamaidon käyttäminen voi altistaa tartunnalle (Desmaures ym. 1997).

Sikojen lisäksi *Y. enterocoliticaa* esiintyy myös monissa muissa eläinlajeissa ja ympäristössä (Fredriksson-Ahomaa ym. 2006, Le Guern ym. 2016). *Y. enterocoliticaa* esiintyy niin kotieläimissä kuin luonnonvaraisissa eläimissä. Kotieläimistä sika ja koira kantavat yleisemmin ihmisille patogeenisiä kantoja kun taas siipikarja, nauta, lammas ja luonnonvaraiset eläimet kantavat ei-patogeenisiä ympäristöperäisiä kantoja (Liang ym. 2015). Suomessa teurastetuissa alle vuoden ikäisissä lampaissa on kuitenkin havaittu *Y. enterocolitican* bioserotyyppejä 2/O:9 ja 5/O:3 (Joutsen ym. 2016).

Y. enterocoliticaa esiintyy maailmanlaajuisesti, mutta sen esiintyminen korreloi ympäristötekijöiden kuten korkeuden, sademäärän ja lämpötilan kanssa (kirjassa Carniel ym. 2006, Liang ym. 2015). Liang ym. 2015 havaitsivat *Y. enterocolitican* esiintyvyyden kotieläimissä korreloivan negatiivisesti korkeuden ja keskilämpötilan kanssa ja positiivisesti sademäärän kanssa.

Yersinioosi

Y. enterocolitican ja *Y. pseudotuberculosis* aiheuttamaa suolistotulehdusta kutsutaan yersinioosiksi. Yersinioosi on kolmanneksi yleisimmin esiintyvä bakteeriperäinen suolistotulehdus Suomessa ja koko Euroopan unionin alueella *Salmonellan* ja *Campylobacterien* jälkeen (kirjassa Pitkälä ym. 2009). *Yersiniat* ovat psykrotrofisia eli ne kykenevät lisääntymään jääkaappilämpötiloissa, mikä saattaa selittää yersinioosin yleistymisen 50-luvulla jääkaappien yleistymisen myötä. Tuoreen elintarvikkeen bakteeripitoisuus ei välttämättä ole riittävä aiheuttamaan infektiota heti syötynä, mutta muutaman päivän jääkaappisäilytyksen jälkeen bakteerien määrä on saattanut lisääntyä infektion aiheuttamiseen tarvittavaan määrään (kirjassa Carniel ym. 2006). Sairastuvuus yersinioosiin on korkeampi lämpötilaltaan lauhkean tai kylmän ilmaston maissa (kirjassa Carniel ym. 2006). Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen tartuntatautirekisterin mukaan vuonna 2015 Suomessa ilmoitettiin 560 *Y. enterocolitica* -tapausta. Koko maassa

ilmaantuvuus oli 10/100 000 asukasta kohti. *Y. pseudotuberculosis* –tapauksia ilmoitettiin 16, jolloin ilmaantuvuus oli 0,3/100 000 asukasta kohti (THL, tartuntatautirekisteri 2015).

Y. enterocolitica ja *Y. pseudotuberculosis* ovat suolistopatogeenisiä ja niiden infektiopaikka on useimmiten distaalinen ileum ja proksimaalinen koolon (kirjassa Pitkälä ym. 2009). *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* kykenevät tunkeutumaan suoliston epiteeliin, mikä tapahtuu yleensä makromolekyylien tunnistamiseen ja kuljettamiseen erikoistuneiden M-solujen kautta. Yersinioosin oireet vaihtelevat suuresti riippuen bakteerin biotyypistä sekä potilaan iästä ja immuunipuolustuksesta. Riskiryhmään kuuluvat, kuten lapset, vanhukset ja immuunivajavaiset henkilöt, mutta myös terveet aikuiset voivat sairastua. Yersinioosin oireita voivat olla ripuli, oksentelu ja kuume (kirjassa Pitkälä ym. 2009). Bakteerit voivat myös kulkeutua lymfan mukana imusolmukkeisiin ja aiheuttaa siellä tulehdusta ja mikroabsesseja (kirjassa Pitkälä ym. 2009). Suoliliepeen imusolmuketulehdus aiheuttaa kipua oikealla puolella alavatsassa, mikä muistuttaa akuuttia umpisuolen tulehdusta (kirjassa Pitkälä ym. 2009).

Pahimmassa tapauksessa yersinioosi voi edetä sepsikseksi. Sepsiksen riskiryhmässä ovat rautaylikuormituksesta kärsivät henkilöt kuten sirppisoluanemiasta tai hemokromatoosista kärsivät potilaat sekä maksasairautta tai diabetesta sairastavat henkilöt. Systeeminen infektio on mahdollista saada myös verensiirron seurauksena, jos luovuttajan veressä on luovutushetkellä ollut bakteereja. Yhteistä tapauksille on veren tai punasolujen yli kolmen viikon säilytys jääkaapissa (kirjassa Carniel ym. 2006).

2.1.2. Ympäristölajit

Suurin osa *Yersinia*-lajeista on niin kutsuttuja ympäristölajeja. Enemmistö ympäristölajeista on erotettu omaksi lajikseen *Y. enterocolitica* ja niistä on aikaisemmin käytetty myös nimitystä *Y. enterocolitican* kaltaiset lajit (*Y. enterocolitica*-like species) (kirjassa Carniel ym. 2006). Ympäristölajeja esiintyy maaperässä ja vesistöissä, mutta niitä eristetään säännöllisesti myös elintarvikkeista ja toisinaan ihmisten ja eläinten ruoansulatuskanavasta (kirjassa Carniel ym. 2006).

Bercovier työryhmineen tunnisti *Y. kristenseniin* vuonna 1980. *Y. kristenseniitä* on eristetty muun muassa pintavesistä, siasta, ihmisestä, naudasta ja elintarvikkeista kuten sianlihasta,

vihanneksista ja kermakakuista (Shayegani ym. 1981, Fukushima ym. 1983, Ahmedy ym. 1985, Delmas & Vidon 1985). *Y. kristenseniin* erottamista patogeenisista kannoista vaikeuttaa sen heikko reaktio pyratsinamidaasitestissä (Bercovier ym 1980). Ympäristölajeja ei pidetä patogeenisina ihmisille, vaikka niitä toisinaan ihmisistä eristetäänkin (kirjassa Carniel ym. 2006).

2.2. Taudinaiheuttamiskyky

Patogeenisilla *Yersinia*-lajeilla on monia erilaisia plasmidivälitteisiä ja kromosomaalisia virulenssitekijöitä, joiden avulla ne kykenevät kiinnittymään kudoksiin, invasoitumaan soluihin ja välttämään isännän immuunipuolustusta. Patogeenin ja isännän välistä vuorovaikutusta välittävät adhesiinit ovat bakteerin ulkokalvolla sijaitsevia proteiineja. Eri adhesiinit toimivat infektion eri vaiheissa toisiaan täydentäen. Osa virulenssitekijöistä on yhteisiä *Y. pestikselle*, *Y. pseudotuberculosis* ja *Y. enterocolitica*lle, osa taas on ominaisia tietyille lajille (Mikula ym. 2013).

2.2.1. Kromosomaaliset tekijät

High-pathogenicity island

Korkeapatogeenisilla *Yersinia*-kannoilla on kromosomaalinen useista geeneistä koostuva korkeapatogeeninen saareke HPI (high-pathogenicity island) (kirjassa Jeannine ym. 2015, Schubert ym. 1998). HPI löytyy *Y. pseudotuberculosis*in serotyypeiltä O:1 ja O:3, *Y. enterocolitica*in biotyypiltä 1B ja kaikilta *Y. pestiksen* biotyypeiltä (kirjassa Carniel ym. 2006). HPI havaittiin ensimmäisenä patogeenisilla *Yersinia*-lajeilla, mutta myöhemmin on selvinnyt, että monilla muillakin Enterobacteriaceae-heimoon kuuluvilla bakteereilla, kuten *E. coli*lla on HPI. HPI antaa bakteerille kyvyn viedä eukaryoottisolun molekyyliin sidottuja rautaioneja yersiniabaktiini-nimisen systeemin avulla. Yersiniabaktiini on pieni molekyyli (482 Da), jolla on erittäin suuri affiniteetti rautaa kohtaan (kirjassa Carniel ym. 2006, Schubert ym. 1998).

Invasiini

Invasiini on *inv*-geenin koodaama bakteerisolun ulkokalvoproteiini. Invasiinia ilmennetään myös alhaisissa lämpötiloissa esimerkiksi jääkaappiin varastoiduissa elintarvikkeissa. Sitä ilmennetään siis jo ennen kuin bakteeri on päässyt isännän elimistöön (Mikula ym. 2013). Invasiinia ilmennetään maksimaalisesti 25 °C:ssa ja pH:ssa 8. Invasiinin ilmentymisen tehokkuus vaihtelee *Y. enterocolitica*n eri serotyypeillä. Serotyypeillä O:8 ja O:9 invasiinin ilmentämistä vähennetään 37 °C:ssa kun taas serotyypillä O:3 invasiinin ilmentyminen on jatkuvaa. Syytä jatkuvalle invasiinin ilmentämiselle serotyypillä O:3 ei tiedetä (Mikula ym. 2013).

*Y. pseudotuberculosis*ella invasiini on 986 aminohapon pituinen polypeptidi kun taas *Y. enterocolitica*n invasiini koostuu 835 aminohaposta (Grassl ym. 2003). Rakenteeltaan invasiinissa havaitaan viisi erilaista osaa: signaalsekvenssi, hydrofiilinen α -domeeni, tynnyrimäinen β -domeeni, hydrofiilinen α' -domeeni ja solunulkoinen domeeni (Mikula ym. 2013).

Invasiinilla on tärkeä rooli infektion alkuvaiheessa suolen seinämän epiteelin läpäisemisessä (Mikula ym. 2013). Peyerin levyjen basolateraalipuolella invasiini sitoutuu β_1 -integriiniin, mikä saa aikaan isäntäsolun solutukirangan uudelleen muotoutumisen ja bakteerin sisään oton isäntäsoluun. Invaasion tehokkuus riippuu invasiinien ja β_1 -integriinien määrästä. Invasiineja on oltava riittävästi bakteerin ulkokalvolla ja β_1 -integriinejä on oltava riittävästi isäntäsolun pinnalla, jotta kiinnittyminen isäntäsoluun johtaa bakteerin sisäänottoon (Mikula ym. 2013).

Peyerin levyissä bakteeri alkaa ilmentää toista adhesiinia YadA:ta, joka suojaa bakteeria isännän immuunipuolustukselta ja hillitsee invasiinin ilmentymistä (Mikula ym. 2013). Sekä invasiini että YadA ovat tarpeellisia suolistopatogeeneille, minkä takia niitä koodaavat geenit ovat inaktivoituneet *Y. pestis*eltä tarpeettomina (Mikula ym. 2013).

Enterotoksiini Yst

yst-geeni koodaa 71 aminohapon pituista polypeptidiä, jonka N-terminaalin 18 aminohappoa toimivat signaalin välityksessä ja C-terminaalin 30 aminohappoa toimivat lämmönkestävänä enterotoksiinina Yst (Delor ym. 1990). Toksiinin toiminta muistuttaa *E. coli*n vastaavaa toksiinia (Boyce ym. 1979). Yst-toksiini aktivoi isännän guanylaattisyklaasin, mikä saa aikaan nesteen kertymisen suoleen, johtuen syklisen guanosiinimonofosfaatin pitoisuuden lisääntymisestä suolen epiteelisoluissa (kirjassa Carnie ym. 2006, Revell ja Miller 2001). Nesteen kertyminen suoleen saattaa johtaa ripuliin (Revell ja Miller 2001).

Yst-toksiineja on tunnistettu kolme YstA, YstB ja YstC (Bhagat ja Viridi 2011). Toksiinia YstA tuottavat patogeeniset biotyypit 1B, 2, 3, 4 ja 5. Ei-patogeeninen biotyyppi 1A tuottaa enterotoksiinia YstB, jonka epäillään olevan osallinen biotyypin 1A mahdollisessa taudinaiheutuksessa. YstC on *Y. enterocolitica*n enterotoksiineista harvinaisin ja vain muutaman kannan on havaittu tuottavan sitä (Bhagat ja Viridi 2011).

Ail

Kromosomaalisen *ail*-geenin koodaama Ail-proteiini on bakteerin ulkokalvon proteiini, joka osallistuu monella tavalla bakteerin taudinaiheutukseen. *ail*-geenistä ja sen koodaamasta proteiinista kerrotaan lisää kappaleessa 2.3.

2.2.2. Plasmidivälitteiset tekijät

Virulenssiplasmidi pYV

Virulenssiplasmidi pYV on 70 kiloemäksen kokoinen plasmidi, jota kaikki ihmisille patogeeniset *Yersinia*-kannat kantavat (Mikula ym. 2013). Virulenssiplasmidi on välttämätön *Yersinian* virulenssille, mutta se ei kuitenkaan yksinään riitä yleensä aiheuttamaan infektiota vaan kromosomaalisia virulenssitekijöitä tarvitaan myös (Miller ym. 1989). Patogeenisuuden tutkiminen virulenssiplasmidin avulla on haastavaa, koska plasmidi usein häviää kasvatettaessa bakteeria viljelmässä (Miller ym. 1989). Virulenssiplasmidin tärkein

virulenssigeeni on *yadA*, joka koodaa bakteerin ulkokalvon adhesiinia YadA (Mikula ym. 2013).

YadA

Virulenssiplasmidissa pYV sijaitseva geeni *yadA* koodaa *Yersinian* virulenssille tärkeää adhesiinia YadA. YadA:lla on monia *Yersinian* patogeenisuuteen vaikuttavia tehtäviä kuten adheesio ekstrasellulaarimatriksin molekyyleihin, autoagglutinaatio, seerumin vastustaminen, fagosytoosin vastustaminen ja invaasio (Mikula ym. 2013). YadA:n ilmentymistä säätelee lämpötila. Altistuminen 37 °C:lle aktivoi *yadA*-geenin ja käynnistää YadA:n tuottamisen (Mikula ym. 2013). YadA:ta ilmentävät enteropatogeeniset *Yersiniat* eli *Y. enterocolitica* (biotyypit 1B ja 2 – 5) ja *Y. pseudotuberculosis*. *Y. enterocolitica* virulenssille YadA on välttämätön, mutta *Y. pseudotuberculosis* ei (Mikula ym. 2013). Myös *Y. pestis* löytyy YadA:ta koodaava geeni *yadA*, mutta yhden nukleotidin puuttumisen takia geeni on *Y. pestis* toimimaton. *Y. pestis* on kuitenkin YadA:ta muistuttavat pintaproteiinit YadB ja YadC (Mikula ym. 2013).

YadA:n pituus vaihtelee 422 ja 455 aminohapon välillä. Se muodostaa tikkukaramellin muotoisen rakenteen bakteerin solukalvosta ulospäin. YadA:n tärkein tehtävä on adheesio. Se kykenee sitoutumaan useisiin eri kollageenityyppeihin ja muihin soluväliaineen molekyyleihin. YadA:n kollageeniin muodostama sidos on erittäin stabiili ja kestää pH:n ja lämpötilan muutoksia sekä proteaaseja ja ureaa (Mikula ym. 2013). *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* YadA on erilainen. *Y. enterocolitica* YadA sitoutuu eri kollageenityyppeihin paljon suuremmalla affiniteetilla kuin muihin ekstrasellulaarimatriksin molekyyleihin. *Y. pseudotuberculosis* YadA:ssa on ylimääräinen 31 aminohapon pituinen alue, mikä saa aikaan sen, että YadA sitoutuu mieluummin fibronektiiniin kuin kollageeniin (Mikula ym. 2013). Myös YadA:n välittämä invaasio eroaa *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* välillä. *Y. pseudotuberculosis* YadA välittää invaasiota silloin kuin invasiini-aktiivisuus on vähäinen (Mikula ym. 2013). YadA kykenee sitoutumaan eri solutyyppeihin kuten epiteelisoluihin, neutrofiileihin ja makrofageihin (Mikula ym. 2013).

YadA:lla on myös osuutta komplementin kaikkien kolmen aktivaatioreitin (klassinen aktivaatio, vaihtoehtoinen aktivaatio ja lektiinin kautta tapahtuva aktivaatio) käynnistymisen

estämisessä, mikä on erityisen tärkeää *Y. enterocolitica*lle. YadA sitoutuu komplementtia säätelevään H-tekijään ja C4b-proteiiniin estämällä näin komplementtireitin käynnistymisen (Mikula ym. 2013).

YadA:lla on myös muita tehtäviä. Se saa aikaan autoagglutinaatiota, jonka ajatellaan auttavan bakteeria välttämään isännän immuunipuolustusta ja säilymään isännän elimistössä pidempään. YadA:n on myös todettu kaneilla pystyvän sitoutumaan suolen limaan, musiiniin ja sukasauman vesikkeleihin, mikä saattaa auttaa suolen kolonisaatiossa. Lisäksi YadA toimii kiinnittymisalustana tyypin III injektiosomille, joka toimittaa Yop-proteiinit fagosyyttien solulimaan (Mikula ym. 2013).

Yop-proteiinit

Virulenssiplasmidissa sijaitsevat myös *yop*-geenit, jotka koodaavat sytotoksisia Yop-proteiineja. Kaikki kolme ihmisille patogeenista *Yersinia*-lajia siirtävät sytotoksisia Yop-proteiineja isäntäsoluun tyypin III sekreetiosysteemin kautta, mikä vaatii solukontaktia toimiakseen (Tsang ym. 2010). Isäntäsolun solulimaan injektoidut Yop-proteiinit häiritsevät solutukirangan toimintaa estäen makrofagien ja granulosyyttien fagosytoositoiminnan (Cornelis 2002). Yop-proteiinit haittaavat myös tulehdusreaktiota edistävien sytokiiniin, kemokiiniin ja adheesiomolekyylien tuoton. Yop-proteiinit mahdollistavat patogeenisten *Yersinioiden* kyvyn selvitä isännän immuunipuolustukselta ja lisääntymisen imukudoksessa (Cornelis 2002).

Yop-proteiinit siirretään isäntäsoluun tyypin III sekreetiosysteemin kautta, jota kutsutaan myös nimellä Ysc-sekreetiosysteemi (Cornelis 2002). Ysc-sekreetiosysteemiä on havaittu patogeenisten *Yersinia*-lajien lisäksi monilla muilla patogeenisillä gramnegatiivisilla lajeilla kuten *Salmonella*lla ja *E. coli*lla (Cornelis 2002). Systeemi koostuu neulamaisesta Ysc-injektiosomista ja erilaisista Yop-proteiineista. Osa proteiineista osallistuu varsinaisten vaikuttavien proteiinien kuljetukseen kohdesolun solukalvon läpi, muodostaen niille kanavan. Osa vaikuttaja-proteiineista vaikuttaa solutukirangan toimintaan ja osa estää tulehdusreaktion muodostumista (Cornelis 2002). Injektiosomien rakentaminen bakteerin solukalvolle aktivoituu lämpötilan vaikutuksesta. Ruumiinlämpö eli noin 37 °C aktivoi sekreetiosysteemin tuottamisen solukalvolle. Yop-proteiineja ei kuitenkaan eritetä

soluviljelmässä, jossa ei ole eukaryoottisoluja läsnä, mikä viittaa siihen, että solukontakti vaaditaan tapahtuman käynnistämiseen (Cornelis 2002).

Plasmidi pPCP1

Plasmidi pPCP1 on *Y. pestikselle* ominainen plasmidi, eikä sitä ole muilla *Yersinia*-lajeilla. Plasmidin tärkein tuote on plasminogeeniaktivaattori (Pla) (Mikula ym. 2013). Pla on ulkokalvon proteiini *Y. pestiksellä*. Pla:ta ilmennetään voimakkaasti *Y. pestiksen* invasoituessa isäntään. Pla:n tehtävä on aktivoida plasminogeeni fibriiniä pilkkovaksi plasmiiniksi. Plasmiini heikentää ekstrasellulaarimatriksia aktivoimalla matriksin metalloproteinaasit. Pla mahdollistaa *Y. pestiksen* nopean invasoitumisen isäntään ja vaeltamisen imukudokseen. Pla myös heikentää laminiinia ja verisuonivaurion jälkeen muodostuneita fibriinihiyrytymiä, mikä edelleen nopeuttaa *Y. pestiksen* leviämistä vaurioiden kautta. Pla myös edistää *Y. pestiksen* sytotoksisuutta osallistumalla Yop-proteiinien kuljettamiseen epiteelisoluihin (Mikula ym. 2013).

2.3. *ail*-geeni

Kromosomaalinen *ail*-geeni, joka on pituudeltaan korkeintaan 650 emäsparia, koodaa bakteerin ulkokalvon Ail-proteiinia (Miller ja Falkow 1988). *ail*-geenin ajatellaan löytyvän vain patogeenisilta kannoilta, minkä takia sitä käytetään kohdegeeninä PCR-menetelmässä patogeenisten ja ei-patogeenisten kantojen erottamiseen toisistaan (Kraushaar ym. 2011). *ail*-geeniä kohteenaan käyttävistä PCR-määrittelyistä on tullut nopeutensa takia vakiintunut menetelmä patogeenisten kantojen havaitsemiseksi (Kraushaar ym. 2011). Kuitenkin *ail*-geeniä on sittemmin havaittu myös ei-patogeenisilla kannoilla (Cheyne ym. 2010, Kraushaar 2011, Liang 2014, Sihvonen ym. 2011, Zheng ym. 2008). Taulukossa 1 on esitetty *Y. enterocolitica* biotyypin 1A *ail*-positiivisiksi todettuja kantoja, joiden *ail*-geeni on sekvensoitu.

Taulukko 1. *ail*-positiivisia *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantoja.

Kannan nimi	<i>ail</i> -geenin koko (bp)	GenBank	Lähde	Eristysmaa	Viite
SDWL-003	486	JX972143.1	Vuohi	Kiina	Liang ym. 2014
2006RAT	489	JX972144.1	Jyrsijä	Kiina	Liang ym. 2014
Ye30-09	489	FR847859.1	Sianliha	Saksa	Kraushaar ym. 2011
FE81228	394	FN812732.1	Ihminen	Suomi	Sihvonen ym. 2011
FE94338	394	FN812733.1	Porkkana	Suomi	Sihvonen ym. 2011

Kaikilla patogeenisilla *Yersinia*-lajeilla on toimiva *ail*-geeni. Tehokkaimmin *ail*-geeni toimii 37 °C:ssa (Bliska & Falkow 1992). *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* -lajeilla *ail*-geeni toimii vain 37 °C:ssa, mutta *Y. pestis* lajilla myös 26 °C:ssa (Bartra ym. 2007). Jääkaappilämpötilassa *ail*-geeni ei aktivoidu (Bartra ym. 2007).

2.3.1. Ail-proteiinin rakenne

Y. enterocolitica *ail*-geeni koodaa noin 178 aminohapon pituista polypeptidiä, jota kutsutaan Ail-proteiiniksi (Miller ym. 1990). Ail-proteiini on molekyylipainoltaan noin 17 kD ja se sijaitsee bakteerin ulkokalvolla (Miller ym. 1989). Ail-proteiinin rakennetta on eniten tutkittu *Y. pestis* -kannalla, koska sitä pidetään mahdollisena kohteena rokotteita kehitettäessä (Yamashita

ym. 2011). *Y. pestis* Ail-proteiini muodostuu kahdeksasta säikeestä, jotka muodostavat β -laskoksen. β -laskos on kiertynyt muodostaen tynnyrimäisen rakenteen, joka ei kuitenkaan muodosta kanavaa solukalvon läpi (Yamashita ym. 2011). β -laskoksen säikeet ovat pituudeltaan 10 – 18 aminohappotähdettä. Tynnyrin muotoon kiertynyt β -laskos on korkeudeltaan 53 Å (5,3 nm) (Yamashita ym. 2011). β -laskoksesta lähtee neljä solunulkoista silmukkaa; L1, L2, L3 ja L4. Silmukoista L2 ja L3 ovat merkittävästi pidempiä kuin L1 ja L4 (Yamashita ym. 2011).

2.3.2. Merkitys

Miller ym. (1989) todistivat tutkimuksessaan, että *ail*-geenillä on merkitystä bakteerin invasoituessa isäntäsoluun. He siirsivät *ail*-geenin *Y. enterocolitica* biotyypin 1B kannalta 8081 *E. coli* kannalle HB101, jolla ei normaalisti ole kykyä invasoitua eukaryoottisoluihin. *ail*-geenin ansiosta *E. coli* kykeni invasoitumaan ihmisen kurkunpään epiteelisoluihin (Hep-2).

Myöhemmin Miller työryhmineen osoitti mutatoimalla Ail-proteiinin silmukoita, että silmukat L1 ja L4 eivät olleet yhteydessä Ail-proteiinin patogeenisiiin ominaisuuksiin. Sen sijaan L2:lla ja L3:lla todettiin olevan yhteyttä patogeenisuuteen (Miller ym. 2001). Ail-proteiinin silmukoiden L2 ja L3 osoitettiin olevan yhteydessä bakteerin kykyyn invasoitua isäntään. Mutaatiot silmukoissa L2 ja L3 heikensivät kykyä invasoitua kiinankääpiöhamsterin munarauhasen soluihin (Miller ym. 2001).

Ail-proteiini toimii adhesiinina kiinnittäen bakteerin isäntäsoluun. Yamashita työryhmineen (2011) osoitti Ail-proteiinin sitoutuvan soluväliaineen laminiiniin ja paikansi sitoutumiskohdan ristin muotoisen laminiinin kärkeen alueelle nimeltään LG4-5. Laminiinin lisäksi Ail-proteiini sitoutuu soluväliaineen säikeistä fibronektiiniin kun taas sitoutumista kollageenin tyyppeihin I ja IV ei havaittu (Tsang ym. 2010, Yamashita ym. 2011). Lisäksi sitoutuminen laminiiniin ja fibronektiiniin oli yhteydessä Yop-proteiinien kuljettamiseen isäntäsoluun (Tsang ym. 2010, Yamashita ym. 2011). Ail-proteiinin vuorovaikutuksen häiriintyminen fibronektiinin ja laminiinin kanssa vähensi Yop-proteiinien kuljetusta isäntäsoluun, jonka seurauksena bakteerin sytotoksisuus heikentyi (Tsang ym. 2010, Yamashita ym. 2011). Yop-proteiinien toimittamisesta isäntäsoluun *Y. enterocolitica* ja *Y. pseudotuberculosis* vastaavat invasiini ja YadA. Ne eivät kuitenkaan ole toiminnassa

Y. pestiksellä, joten Ail-proteiinilla on merkittävä rooli Yop-proteiinien kuljettajana. Yop-proteiinien kuljetus isäntäsoluun on välttämätöntä *Y. pestiksen* patogeenisuudelle (Tsang ym. 2010).

Seerumin vastustaminen

Seerumin vastustaminen on tärkeää, jotta bakteeri voi selvitä ja lisääntyä isännän kudoksissa (Bliska & Falkow 1992). *ail*-geenin on osoitettu olevan yhteydessä komplementtisysteemin vastustamiseen ja lämpötilan vaikuttavan tähän (Bliska & Falkow 1992). Bliska ja Falkow (1992) tutkivat kannan DP5102 kykyä vastustaa ihmisen seerumia. Kanta DP5102 on muunneltu patogeenisesta *Y. enterocolitica*n kannasta 8081 niin, että siltä puuttuvat sekä virulenssiplasmidi että toimiva *inv*-geeni. Kun DP5102-kantaa kasvatettiin 37°C:ssa, se oli vastustuskykyinen ihmisen seerumille kun taas 28 °C:ssa kasvatettuna herkkä (Bliska & Falkow 1992).

Mekanismi, jolla Ail-proteiini vastustaa komplementtisysteemiä on vastaavanlainen kuin YadA:lla. Ail estää vaihtoehtoisen komplementtireitin käynnistymisen sitoutumalla H-tekijään, mikä estää komplementtiproteiinin C3 hajoamisen ja vaihtoehtoisen komplementtireitin käynnistymisen (Biedzka-Sarek ym. 2008). Klassista komplementin aktivaatioreittiä ja lektiinivälitteistä reittiä säätelee C4bp. Ail-proteiinin on osoitettu pystyvän sitomaan C4bp:n, jolloin klassinen ja lektiinivälitteinen reitti ei pysty käynnistymään (Kirjavainen ym. 2008).

2.4. DNA:n monimuotoisuuden tutkiminen

DNA:n monimuotoisuuden tutkiminen edellyttää, että DNA saadaan ulos organismista ja erotettua organismin muista rakenteista ja molekyyleistä. Yhden organismin DNA ei yleensä riitä jatkotutkimuksiin, joten bakteeriklooneja on oltava riittävästi tai DNA:ta on kyettävä monistamaan. DNA:n tutkimisessa on päästy niin pitkälle, että kokonaisen organismin genomin emäsjärjestys kyetään selvittämään.

2.4.1. DNA:n eristys

DNA:n havaitsi ensimmäisenä sveitsiläinen lääkäri Friedrich Miescher, joka onnistui eristämään DNA:ta leukosyyteistä jo vuonna 1869. Miescherin tarkoituksena oli tutkia leukosyyttien proteiineja, mutta kokeidensa aikana hän havaitsi materiaalia, joka ei vastannut proteiineja ominaisuuksiltaan. Proteiineista poikkeavien ominaisuuksiensa lisäksi materiaalin suuri fosforin pitoisuus viittasi siihen, että Miescher oli löytänyt täysin uudenlaisen molekyylin (Dahm 2005). Miescher jatkoi uuden molekyylin tutkimista ja pyrki kehittämään protokollan, jonka avulla molekyylä saataisiin puhdistettua proteiineista jatkotutkimuksia varten. Nykyaikaisessa DNA:n eristämisessä on edelleen samoja vaiheita kuin Miescherin esittämässä protokollassa (Dahm 2005). Miescherin saavutukset eivät kuitenkaan saaneet arvostusta aikanaan. DNA:n tärkeys ymmärrettiin vasta 1940-luvulla kun sen osoitettiin siirtävän perinnölliset ominaisuudet sukupolvelta toiselle (Dahm 2005).

DNA:n eristuksen tarkoituksena on saada DNA ulos organismista mahdollisimman puhtaana vahingoittamatta kuitenkaan sen rakennetta (kirjassa Nolte 2015). DNA:n eristyksessä käytetään yleensä detergenttejä solun kalvorakenteiden liuottamiseen, proteinaaseja hajottamaan solun proteiineja ja etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA) kelatoimaan kahdenarvoisia kationeja (kirjassa Nolte 2015). Bakteerin ulkokalvon rakenne vaikuttaa työvaiheiden määrään ja käytettäviin komponentteihin. Grampositiivisten bakteerien DNA:n eristys vaatii enemmän työvaiheita kuin gramnegatiivisten, johtuen erilaisesta ulkokalvon rakenteesta. Grampositiivisilla bakteereilla on paksumpi peptidoglykaanikerros, jonka sokereiden välisien liitosten hajoamista voidaan helpottaa esimerkiksi lysotsyymi-entsyymillä.

Pelkistetty esimerkki DNA:n eristämisestä nestemäisessä kasvatusliemessä kasvatetuista gramnegatiivisista bakteereista Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit -menetelmällä.

1. Bakteerien kasvatuslientä siirretään Eppendorf-putkeen. Eppendorf-putkea lingotaan sentrifugissa, jotta bakteerit sakkautuvat pelletiksi putken pohjalle. Kasvatusliemi poistetaan varovasti pipetillä.
2. Bakteeripelletti liuotetaan kitin mukana tulleeseen puskuriin (buffer ATL) ja lisätään proteinaasi K -entsyymiä, joka hajottaa bakteerien rakenteita. Rakenteiden hajoamista voidaan nopeuttaa lämpötilan nostamisella ja sekoittamisella. Lämpötilaa ei tule nostaa yli 55 °C, koska tätä suuremmat lämpötilat voivat inaktivoida proteinaasi K -entsyymien.
3. Lisätään 96 – 100 % etanolia DNA:n saostamiseksi. Saostunut DNA näkyy vaaleanharmaana rihmana.
4. Liuos siirretään kaksiosaiseen putkeen, jossa DNA jää päällimmäisessä osassa olevaan kalvoon. Putkea lingotaan sentrifugissa, jotta kaikki neste valuisi alimpana olevan osan keräysputkeen. Keräysputki nesteineen heitetään pois ja DNA:n sisältävä kalvo-osa kiinnitetään uuteen keräysputkeen.
5. DNA:ta pestään bakteerin proteiineista ja kalvorakenteista kitin mukana tulleilla konsentraateilla (buffer AW1 ja buffer AW2). Putkea lingotaan sentrifugissa, jotta muut molekyylit kuin DNA valuisivat keräysputken pohjalle. Nestemäisen osan sisältävä keräysputki vaihdetaan uuteen.
6. DNA:n sisältävä kalvo-osa siirretään Eppendorf-putkeen. Kalvolle pipetoidaan kitin mukana tullutta eluointipuskuria (buffer AE), jolloin DNA irtaantuu kalvolta ja valuu Eppendorf-putkeen. Putkea lingotaan sentrifugissa, jotta DNA saadaan putken pohjalle nesteen mukaan. Viimeinen vaihe voidaan toistaa kahdesti DNA:n saannon maksimoimiseksi.

2.4.2. PCR

PCR (polymerase chain reaction) eli polymeraasiketjureaktio on Kary Mullisin kehittämä menetelmä, jonka avulla DNA:ta saadaan kopioitua lyhyessä ajassa suuri määrä (kirjassa Markey ym. 2013, Mullis 1990). Mullisin tarkoituksena oli kokeilla DNA:n sekvensointia muuntelemalla jo aiemmin kehitettyä Sangerin sekvensointimenetelmää (Mullis 1990).

Suunnitellessaan sekvensointikoettaan vuonna 1983 Mullis sai kuitenkin ajatuksen, joka johti polymeraasiketjureaktion kehittämiseen (Mullis 1990). Kary Mullisille myönnettiin keksinnöstään kemian Nobelin palkinto vuonna 1993.

PCR on syklinen prosessi, jossa jokaisen syklin aikana DNA:n määrä kaksinkertaistuu (kirjassa Markey ym. 2013). PCR-sykliä toistetaan yleensä 30 – 40 kertaa riippuen siitä kuinka paljon DNA:ta halutaan (kirjassa Markey ym. 2013). PCR:n toiminta perustuu lämpötilan vaihteluun ja lämpöä kestävä DNA polymeraasin toimintaan. DNA polymeraasi on alun perin eristetty kuumissa lähteissä elävästä *Thermus aquaticus* -bakteerista (kirjassa Markey ym. 2013). Reaktion jokaisessa syklissä on kolme vaihetta, joissa jokaisessa on eri lämpötila. Ensimmäisessä vaiheessa lämpötila nostetaan 93 - 94 °C:een, jolloin DNA-juosteita yhdessä pitävät vetysidokset purkautuvat ja juosteet eroavat toisistaan (kirjassa Markey ym. 2013). Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan niin, että monistettavan alueen mukaan suunnitellut alukkeet pariutuvat yksijuosteisten DNA-fragmenttien kanssa. Toisen vaiheen lämpötila riippuu käytettävästä alukkeesta, mutta se on yleensä 50 – 60 °C (kirjassa Markey ym. 2013). Kolmannessa vaiheessa DNA polymeraasi luo nukleotideista uuden juosteen alukkeiden perään. Tämä tapahtuu noin 72 °C:ssa, mikä on DNA polymeraasin toiminnalle optimaalisin lämpötila (kirjassa Markey ym. 2013).

PCR:ää sovelletaan usealla tavalla. Käänteiskopioijaentsyymien avulla PCR:llä voidaan RNA kääntää komplementaariseksi DNA:ksi (kirjassa Markey ym. 2013). Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytetään hyväksi fluoresoivia merkkiaineita, jolloin PCR-tuotteen määrää voidaan seurata reaktion ollessa käynnissä (kirjassa Markey ym. 2013).

2.4.3. Sekvensointi

Tarve DNA:n sekvensointiin on nykyaikana suuri ja uusia sovellusmahdollisuuksia tulee koko ajan useilta tutkimusaloilta. Sekvensointia käytetään muun muassa soveltavassa lääketieteessä diagnostiikkaan ja terapeutiikkaan (Metzker 2005).

Frederick Sanger kehitti DNA:n sekvensoimiseen Sangerin sekvensointimenetelmän vuonna 1975 (Metzker 2005). Sangerin menetelmässä käytetään kahdenlaisia nukleotideja: tavallisia nukleotideja ja dideoksinukleotideja. Tavallisista nukleotideista DNA polymeraasi rakentaa

uutta vastinjuostetta yksijuosteisen mallin mukaan. Muokatut dideoksinukleotidit päättävät uuden juosteen synteessin, koska DNA polymeraasi ei voi liittää uutta nukleotidia dideoksinukleotidin perään puuttuvan OH-ryhmän takia. Tavallisten ja muokattujen nukleotidien suhde reaktiossa määrittää kuinka tiheään reaktio päättyy (Metzker 2005). Lopputuloksena on erimittaisia DNA-fragmentteja, jotka erotellaan koon mukaan geelielektroforeesilla (Metzker 2005). Muokatut nukleotidit on leimattu fluoresoivalla väriaineella, joten fragmenttien pituuden ja leimattujen viimeisten nukleotidien avulla voidaan päätellä emäsjärjestys (Metzker 2005). Sangerin sekvensointimenetelmä oli hallitseva menetelmä noin kahden vuosikymmenen ajan, kunnes 2000-luvulla alettiin siirtyä uuden sukupolven sekvensointimenetelmiin (next-generation sequencing) (Metzker 2009). Ensimmäinen uuden sukupolven sekvensointimenetelmä tuli kaupallisesti saataville vuonna 2004 (Mardis 2008).

Suurin etu uuden sukupolven sekvensointimenetelmissä on mahdollisuus tuottaa erittäin suuri määrä sekvenssidataa edullisesti (Metzker 2009). Uuden sukupolven sekvensointi kattaa useita menetelmiä, jotka voidaan ryhmitellä karkeasti templaatin valmisteluun, sekvensointiin ja kuvantamiseen sekä datan analysointiin (Metzker 2009). Ainutlaatuinen yhdistelmä spesifisistä protokollista erottaa eri valmistajien menetelmät toisistaan ja määrittää minkä tyyppistä dataa menetelmä tuottaa. Menetelmien erityyppinen data saa aikaan haasteita verratessa menetelmiä toisiinsa (Metzker 2009). Uuden sukupolven sekvensointi –sovelluksia on paljon. Tietty menetelmä soveltuu parhaiten tietyn tyyppiseen biologiseen kokeeseen, esimerkiksi ihmisen kokogenomisekvensointiin, RNA:n sekvensointiin, bakteerien ja yksisoluisten eukaryoottien genomin sekvensointiin (Metzker 2009). DNA:n sekvensointi fossiileista on ollut hankalaa näytteiden hajoavan tilan takia. Uuden sukupolven sekvensointi –menetelmät ovat kuitenkin helpottaneet vanhojen näytteiden tutkimista ja muun muassa luolakarhun, mammutin ja neandertalinihmisen genomi on selvitetty näitä menetelmiä hyväksi käyttäen (Mardis 2008).

3. TYÖN TAVOITTEET JA HYPOTEESI

Ei-patogeenisten *Yersinia*-kantojen *ail*-geenejä on tutkittu melko vähän. Aiemmissa tutkimuksissa, joissa ei-patogeenisten kantojen *ail*-geenejä on sekvensoitu, on ollut mukana vain muutamia kantoja, jotka kaikki kuuluivat *Y. enterocolitica* ei-patogeeniseen biotyyppiin 1A (Liang ym. 2014, Sihvonen ym. 2011). Tutkimuksissa mukana olleiden ei-patogeenisten kantojen *ail*-geeneissä on ollut vain pieniä eroja patogeenisten kantojen *ail*-geeneihin verrattuna. Tämän tutkimuksen tavoitteena on tutkia sekvensoimalla ei-patogeenisten *Y. enterocolitica* 1A- ja *Y. kristensenii*-kantojen *ail*-geenejä. Tämä on ensimmäinen tutkimus näin suurella ei-patogeenisten kantojen näytemäärällä, joiden on todettu kantavan *ail*-geeniä. Olettamuksena on, että tutkittujen *Y. enterocolitica* 1A kantojen *ail*-geenien sekvenssit ovat lähes identtisiä, mutta että eroja löytyy verrattuna patogeenisten kantojen *ail*-geeneihin. Varsinkin ympäristölajin *Y. kristenseniin* ja *Y. enterocolitica* patogeenisten kantojen *ail*-geenien välillä odotetaan löytyvän eroja.

4. MATERIAALI JA MENETELMÄT

4.1 Tutkimuksessa käytetyt kannat

Tutkimuksessa oli mukana 26 kantaa, jotka oli eristetty useasta eri lähteestä: lampaan, villisian, kanan, luonnonvaraisten lintujen, sian ja ihmisen ulosteesta, salaattisekoituksesta, peuran ja hirven ruhosta sekä jyräjien suolesta ja kielestä (taulukko 2). Kannat oli aiemmin reaaliaikaisella PCR:llä todettu *aif*-positiivisiksi ja tunnistettu alustavasti *Y. enterocolitica* biotyypiksi 1A ja *Y. kristenseniiksi*. Kannoista suurin osa oli eristetty Suomessa, mutta villisian ulosteesta eristetyt kannat ja yksi ihmisen ulosteesta eristetty kanta olivat peräisin Sveitsistä ja yksi lintunäyte oli peräisin Ruotsista. Kannat oli eristetty vuosina 1998–2013. Kannat olivat säilötyinä helmiputkiin -70 °C pakastimeen, josta ne siirrettiin uusiin helmiputkiin ja säilöttiin jatkossa -20 °C pakastimeen tätä tutkimusta varten.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytetyt kannat.

Kanta	Lähde	Eristysmaa	Eristysvuosi
HKY 434	Kanan uloste	Suomi	2013
LAS 383	Lampaan uloste	Suomi	2013
LAS 384	Lampaan uloste	Suomi	2013
LAS 517	Lampaan uloste	Suomi	2013
PS 23	Salaattisekoitus	Suomi	2013
WSTY 3	Villisian uloste	Sveitsi	2007
WSTY 160	Villisian uloste	Sveitsi	2008
PR 4	Peuran ruho	Suomi	2013
PR 18	Peuran ruho	Suomi	2013
PR 20	Peuran ruho	Suomi	2013
HR 88	Hirven ruho	Suomi	2013
HR 100	Hirven ruho	Suomi	2013
SO 16	Sorsan uloste	Suomi	2013
TA 27	Tavin uloste	Suomi	2013
MY A ₅ 18D3	Peltohiiren kieli	Suomi	2005
MY F ₅ 28D1	Metsähiiren suoli	Suomi	2005
MY M ₂ 9A27	Peltomyyrän suoli	Suomi	2002
MY M ₂ 9A3	Peltomyyrän suoli	Suomi	2002
MY M34	Peltomyyrän suoli	Suomi	2005
MY M70	Metsämyyrän suoli	Suomi	2005
MY T19D1	Metsämyyrän kieli	Suomi	2002
LIP 5	Kesykyyhkyn uloste	Suomi	1998
YLI 63	Valkoposkihanhen uloste	Ruotsi	2001
YLUU 186	Sian uloste	Suomi	ET ^a
IHI 111299	Ihmisen uloste	Suomi	1999
SWHY 82	Ihmisen uloste	Sveitsi	2007

ET^a = Ei tiedossa

4.2. Kantojen kuvaus

Helmiputkista kannat viljeltiin joko naudanveriagarille (Oxoid, Basingstoke, UK) tai TSA-agarille (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa). TSA- ja verimaljoilla kantoja inkuboitiin 24 h 28 °C lämpötilassa. Veri- tai TSA-agarilta tehtiin bakteerisuspensio liuottamalla reilusti bakteerimassaa 5 ml:aan steriloitua vettä. Bakteerisuspension puhtauden varmistamiseksi kannat viljeltiin uudestaan veriagarille ja CIN-agarille (Yersinia selective agar, Lab M, Lancashire, UK) tiputtamalla tippa bakteerisuspensiota maljalle ja suorittamalla hajalevitys 1 µl:n silmukalla. Veri- ja CIN-agarille viljeltyjen bakteereiden pesäkemorfologia kuvattiin 24 h kuluttua. Lisäksi bakteerisuspensiota käytettiin API 20E:hen ja biokemiallisiin testeihin biotyyppitystä varten. Elatusaineiden ja reagenssien valmistusohjeet on esitetty liitteessä 1.

4.2.1. Kasvu selektiivialustoilla

Kantojen kasvua ja pesäkemorfologiaa kuvattiin *Yersinioille* selektiivisellä CIN-agarilla, joka sisältää kolmea eri antibioottia (kef sulodiini, irgasaani, novobiosiini). CIN-agar vastustaa muun muassa *Escherichia colin*, *Klebsiella pneumoniaen*, *Proteus mirabiliksen*, *Pseudomonas aeruginosan*, *Salmonella enterican*, *Shigella sonnein* ja *Streptococcus faeceaaliksen* kasvua. *Yersiniat* kasvavat CIN-maljalla tyypillisesti keskustaltaan punaisina pesäkkeinä, joita kutsutaan myös häränsilmäpesäkkeiksi.

4.2.2. Sero- ja biotyyppitys

Kantojen biotyyppitys suoritettiin käyttämällä API 20E:tä valmistajan ohjeen mukaan (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Ranska), sokeriputkia (salisiini, trehaloosi, ksyloosi), tween- ja eskuliini-agareita sekä pyratsinamidaasitestia. Ureatesti tehtiin myös ureaputkilla, vaikka se sisältyy myös API 20E:hen.

API 20E on Enterobacteriaceae-heimon bakteerien lajitason tunnistuksen käytettävä testisarja. API 20E koostuu 21 eri biokemiallisesta testistä. Inkubointilämpötila oli 28 °C ja tulkinta suoritettiin 18–24 h kuluttua. Kukin biokemiallinen testi tulkittiin erikseen valmistajan ohjeiden mukaan. Värimuutos tulkittiin positiiviseksi tulokseksi. Positiivisten tulosten perusteella saatiin kullekin kannalle numerosarja. Numerosarja syötettiin apiweb -

tietokantaan (apiweb.biomerieux.com), josta saatiin selville mitä lajia lähimpänä kyseinen kanta on.

Sokeriputkiin lisättiin yksi tippa bakteerisuspensiota noin 0,5 ml:aan sokeriliuosta. Sokeriputkia inkubointiin 24 h 28 °C asteessa. Värin vaihtuminen vihreästä keltaiseksi tulkittiin positiiviseksi reaktioksi.

Kantojen lipaasin käyttöä tutkittiin Tween 80-agarilla (Nutrient agar, Oxoid, Hampshire, UK ja Tween 80, Merck, Hohenbrunn, Saksa). Tween-maljoille siirrettiin bakteerisuspensiota 1 µl:n muovisilmukalla viivoiksi pintaviljelyynä. Tween-maljoja inkuboitiin 28 °C:ssa ja tulkinta suoritettiin 24 h ja 48 h kuluttua. Kasvuston ympärillä näkyvä vaalea puuterimainen kuvio tulkittiin positiiviseksi.

Eskuliinin käyttöä tutkittiin eskuliiniagarilla (Nutrient agar, Oxoid, Hampshire ja eskuliini, Merck, Darmstadt, Saksa). Eskuliini-maljoille siirrettiin bakteerisuspensiota pintaviljelyksi 1 µl:n muovisilmukalla sahalaitakuvioksi. Maljoja inkuboitiin 28 °C asteen lämmössä ja tulkittiin sekä 24 h että 48 h kuluttua. Tulkinta suoritettiin UV-valon alla. Tumma väri bakteerikasvuston ympärillä tulkittiin positiiviseksi.

Pyratsinamidaasiputkiin (PYZ) bakteerisuspensiota viljeltiin 1 µl:n silmukalla vinopinnalle. PYZ-putkia inkuboitiin 28 °C:ssa ja tulkinta suoritettiin 48 h kuluttua ammoniumferro(II)sulfaatista ja vedestä valmistetun reagentin lisäyksen jälkeen. Punainen väri agarin reunalla tulkittiin positiiviseksi.

Ureaputkiin siirrettiin bakteerisuspensiota vinopinnalle 1 µl:n silmukalla. Ureaputkia inkuboitiin 28 °C:ssa ja tulkittiin sekä 24 h että 48 h kuluttua. Värin vaihtuminen oranssista pinkkiin tulkittiin positiiviseksi.

Kannat serotyypitettiin kaupallisilla antiseerumeilla (*Yersinia enterocolitica* Antisera Set, Denka Seiken Co, Tokio, Japani) agglutinaatiotestillä serotypeille O:1/O:2, O:3, O:5, O:8 ja O:9. Bakteerimassaa siirrettiin muutaman pesäkkeen verran muovisilmukalla puhtaalla petrimaljalla olevaan antiseerumitippaan. Negatiivisena kontrollina toimi tippa steriiliä vettä. Maljaa kallistettiin edestakaisin noin minuutin ajan. Rakeiseksi muuttunut antiseerumitippa tulkittiin positiiviseksi tulokseksi.

4.3. DNA:n eristys

DNA:n eristys suoritettiin käyttämällä kaupallista DNeasy® Blood & Tissue Kit-menetelmää (Qiagen, Hilden, Saksa). Veri- tai TSA-maljoilta siirrettiin yksi bakteeripesäke 10 ml:aan TSB-liuosta (Tryptone Soy Broth, Oxoid, Basingstoke, UK). Bakteereita kasvatettiin TSB-liuoksessa 28 °C asteessa 24 h ravistimessa (IKA® KS 260 control, Staufen, Saksa) nopeudella 250 rpm. DNA:n eristys suoritettiin DNeasy® Blood & Tissue Kitin valmistajan ohjeen mukaan 2 ml:sta TSB-liuosta. DNA:n eristyksen viimeinen vaihe eli eluutio suoritettiin kahdesti DNA:n saannon maksimoimiseksi. DNA-pitoisuus varmistettiin käyttämällä Qubit dsDNA BR Assay Kittä (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA) ja Qubit® 2.0 fluorometria (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA). DNA:n saannon riittävänä raja-arvona pidettiin 20 ng/μl. DNA:n puhtaus arvioitiin NanoDrop® ND-1000 spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA). Riittävän puhtaaksi katsottiin DNA-liuos, jonka spektrofotometrin absorbanssisuhde 260/280 oli noin 1,8 ja 260/230 noin 2,0–2,2.

4.4. *ail*-geenin monistaminen

PCR-reaktio ajettiin laitteella PTC-200 DNA Engine Cycler (Hercules, USA). PCR-reaktiossa käytettiin *ail*-geenille spesifisiä alukkeita (Huang ym. 2010). PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 3. PRC-ohjelma on esitetty taulukossa 4. Ennen varsinaista *ail*-geenin monistamista ajettiin lämpötilagradientt ajo, jonka tarkoituksena oli selvittää käytettyjen alukkeiden pariutumislämpötilaksi optimaalinen lämpötila.

Taulukko 3. PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet.

Geeni	Alukkeet	5' → 3'	Viite
<i>ail</i>	ail FWD	GGT TAT TGT ATT AGT ATT GTT	Huang ym. 2010
	ail REV	CAG GTG GGT TTT CAC TAT CTG	Huang ym. 2010

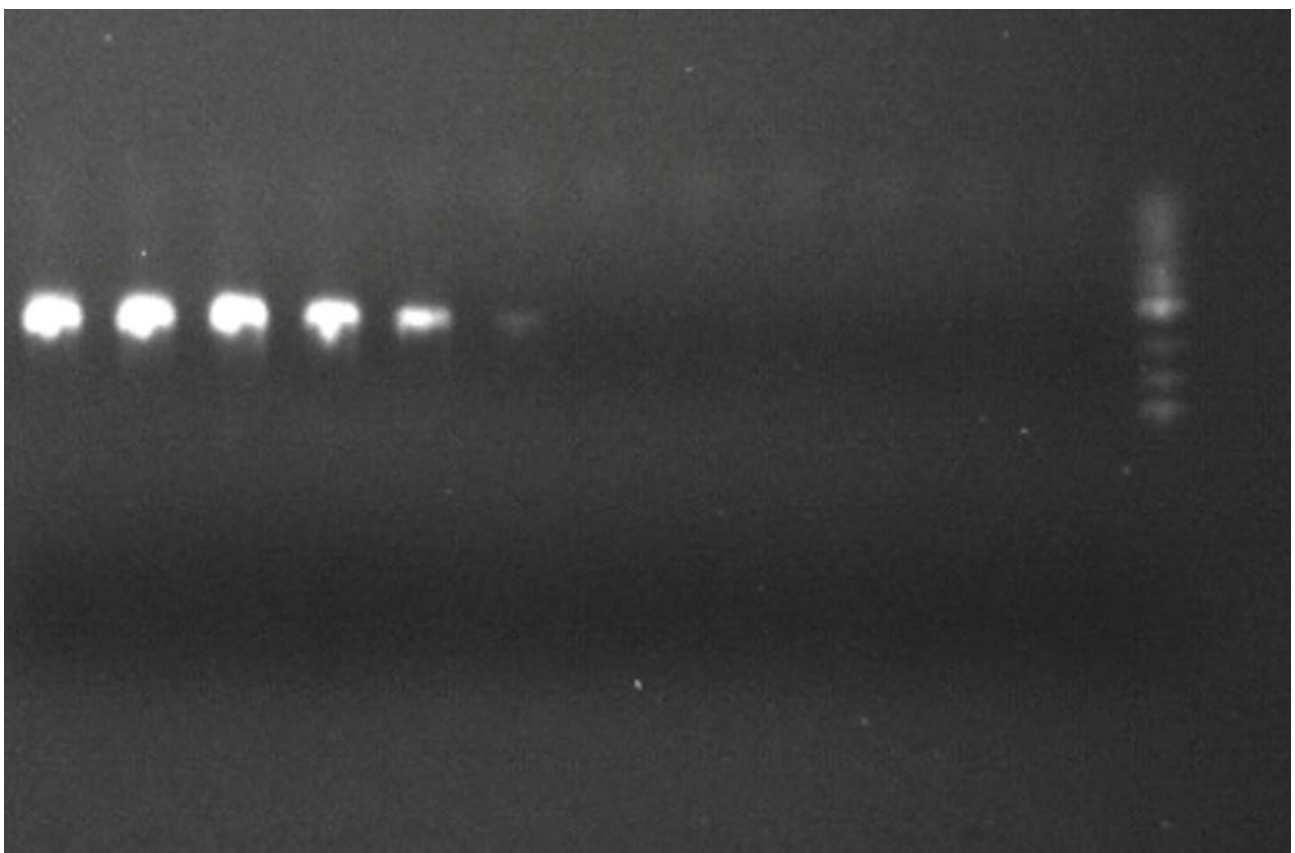
4.4.1. PCR-ohjelman optimointi

Gradientin ajossa selvitettiin 12:sta eri lämpötilasta välillä 50–61 °C, mikä olisi optimaalinen käytettyjen alukkeiden pariutumislämpötilaksi. Gradientin ajo suoritettiin peuran ruhosta peräisin olevalle kannalle PR 4. Gradientin ajo suoritettiin samanaikaisesti kahdella eri DNA-pitoisuudella, jotta saatiin selville sopiva pitoisuus varsinaista PCR-reaktiota varten. Testatut DNA-pitoisuudet olivat 10 ng ja 20 ng DNA:ta 50 µl:ssa PCR-ajoliuosta. Geelielektroforeesikuvan perusteella alukkeiden pariutumislämpötilaksi valittiin 51 °C ja DNA-pitoisuudeksi valittiin 10 ng 50 µl:ssa PCR-ajoliuosta. Kuvassa 1 on esitetty lämpögradientin geelielektroforeesi. Alukkeiden pariutumislämpötilan valitsemisen jälkeen varsinainen PCR-ajo ohjelmoitiin koneelle (taulukko 4).

Taulukko 4. *ail*-geenin monistamiseen käytetty PCR-ohjelma.

Vaihe	Lämpötila	Aika
1. Polymeraasin aktivaatio	95 °C	15 min
2. Denaturaatio ^a	94 °C	30 s
3. Alukkeiden pariutuminen ^a	51 °C	30 s
4. Monistus ^a	72 °C	60 s
5. Stabilointi	72 °C	10 min
6. Jäähdytys	4 °C	→

^a Vaiheet 2-4 toistettiin 30 kertaa



Kuva 1. Gradientin geelielektroforeesi kannalla PR 4. Lämpötilat 50-61 °C vasemmalta oikealle ja markkeri VIII uloimpana oikealla. Alukkeiden pariutumislämpötilaksi valittu 51 °C:n juoste on kuvassa kolmas vasemmalta.

4.4.2. PCR reagenssit

PCR-reaktiossa käytettiin HotStarTaq Master Mix Kit -menetelmää (Qiagen), joka sisälsi HotStarTaq DNA-polymeraasia, jokaista dNTP:ä (deoksiriboosi nukleosiditri-fosfaattia) (400 µM) sekä PCR-puskuria, jossa oli stabilointiainena MgCl₂:a (3 mM).

4.4.3. Alukkeet

PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet (taulukko 2) tilattiin (Oligomer, Helsinki, Suomi) kuiva-aineena. Molemmat alukkeet liuotettiin steriiliin veteen niin, että käyttöliuoksen lopputilavuudeksi tuli 1000 µl, jossa molempien alukkeiden pitoisuus 2 µM. Liuos jaettiin 0,5 ml Eppendorf-putkiin, 100 µl kuhunkin. Putkia säilytettiin -20 °C asteen pakastimessa ja sulatettiin tarvittaessa PCR-reaktiota varten.

4.4.4. PCR-ajoliuos

PCR-ajoliuos valmistettiin 0,5 ml eppendorf-putkiin. Ajoliuos sisälsi HotStarTaq Master Mix Kittä, alukeliuosta, steriloitua vettä ja DNA:ta. Jokaisessa PCR-ajossa oli mukana negatiivinen kontrolli, jossa DNA oli korvattu steriilillä vedellä. PCR-ajoliuoksen valmistusohje on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. PCR-ajoliuoksen valmistusohje.

Reagenssi	Tilavuus
HotStarTaq Master Mix Kit (2X)	25 µl
Alukeliuos (2,0 µM)	5 µl
H ₂ O	19,5 µl
DNA (20 ng/µl)	0,5 µl
Yhteensä	50 µl

4.5. PCR-tuotteen määrän ja laadun varmistaminen

4.5.1 Geelielektroforeesi

PCR-tuotteet ajettiin geelielektroforeesissa ESP 200-laitteella (McKinley Scientific, Sparta, USA) ennen sekvensointia PCR-tuotteen laadun varmistamiseksi. Geeli oli SeaKem® LE Agarose -jauheesta (Rockland, USA) TAE-puskuriin (Amresco, Solon, USA) valmistettu 1 % geeli, jossa väriaineena toimi etidiumbromidi (MP Biomedicals, Illkirch, Ranska). Osa PCR-tuotteista ajettiin 40 ml:n geelissä, osa isommassa (200 ml) geelissä. Isossa geelissä ajo suoritettiin 110 V:ssa, 300 mA:ssa noin 1,5 h. Pienessä geelissä ajo suoritettiin samoissa olosuhteissa, mutta ajoaika oli noin 45 min. Ajossa oli mukana markkeri, jossa pisimmät merkkijuosteet olivat 800 emäsparia. *ail*-geenin PCR-tuotteen haluttu pituus oli 585 emäsparia. Geeli kuvattiin Alphamager 2000 -koneella (Alpha Innotech, San Leandro, Kalifornia, Yhdysvallat).

4.5.2 DNA-pitoisuus ja puhtaus

PCR-tuotteen DNA-pitoisuus varmistettiin Qubit dsDNA BR Assay Kitillä ja Qubit® 2.0 fluorometrillä. DNA:n puhtaus arvioitiin NanoDrop® ND-1000 spektrofotometrillä. Sekvensointiin vaadittava DNA-pitoisuus oli 20 ng/μl ja suositukset spektrofotometrin absorbanssisuhteelle 260/280 oli 1,8 ja suhteelle 260/230 2,0–2,2.

4.6. Sekvensointi

PCR-tuotteet lähetettiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituuttiin (Helsinki, Suomi) puhdistettavaksi ja sekvensoitavaksi. Biotekniikan instituutti käyttää PCR-tuotteiden puhdistukseen Millipore MultiScreen PCR 96 –puhdistusta (Merck Millipore, Darmstadt, Saksa). Sekvensointiin käytettiin Applied Biosystems'in The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kittia (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA). Sekvensointireaktiot suoritettiin valmistajan suositusten mukaisesti. Reaktioiden puhdistukseen käytettiin Agencourt®CleanSEQ Kittia (Becman Coulter, Indianapolis, USA). Itse sekvensointi suoritettiin Applied Biosystems ABI3130XL Genetic Analyzer -koneistolla (Thermo Fisher Scientific Inc, Madison, USA).

4.7. Sekvensointitulosten analysointi

Sekvenssidata käsiteltiin MEGA6.0 -ohjelmalla. Signaalisekvenssin molemmista päistä valittiin kohta, jossa signaali oli kelvollista ja kaikkien kantojen sekvenssit typistettiin samasta kohdasta. Pyrimme pitämään sekvenssit mahdollisimman pitkinä. Typistyksen jälkeen sekvenssien pituudeksi jäi 489 emäsparia. Kantojen sekvenssit linjattiin ClustalW-algoritmilla ja sekvenssejä verrattiin BLAST-ohjelmalla NCBI (National Center for Biotechnology Information) –tietokannasta löytyvien kantojen *ail*-geeneihin. Tietokannasta valittiin referenssikannat, joiden *ail*-geeneihin tutkimuksen kantojen *ail*-geenejä verrattiin. Osa referenssikantojen *ail*-geeneistä oli lyhyempiä kuin tässä tutkimuksessa mukana olleiden kantojen *ail*-geenit. Tasasimme juosteet lyhimmän referenssin kannan *ail*-geenin sekvenssin mukaan ja juosteiden lopulliseksi pituudeksi jäi tässä vertailussa 486 emäsparia. Referenssikannat on esitetty taulukossa 6.

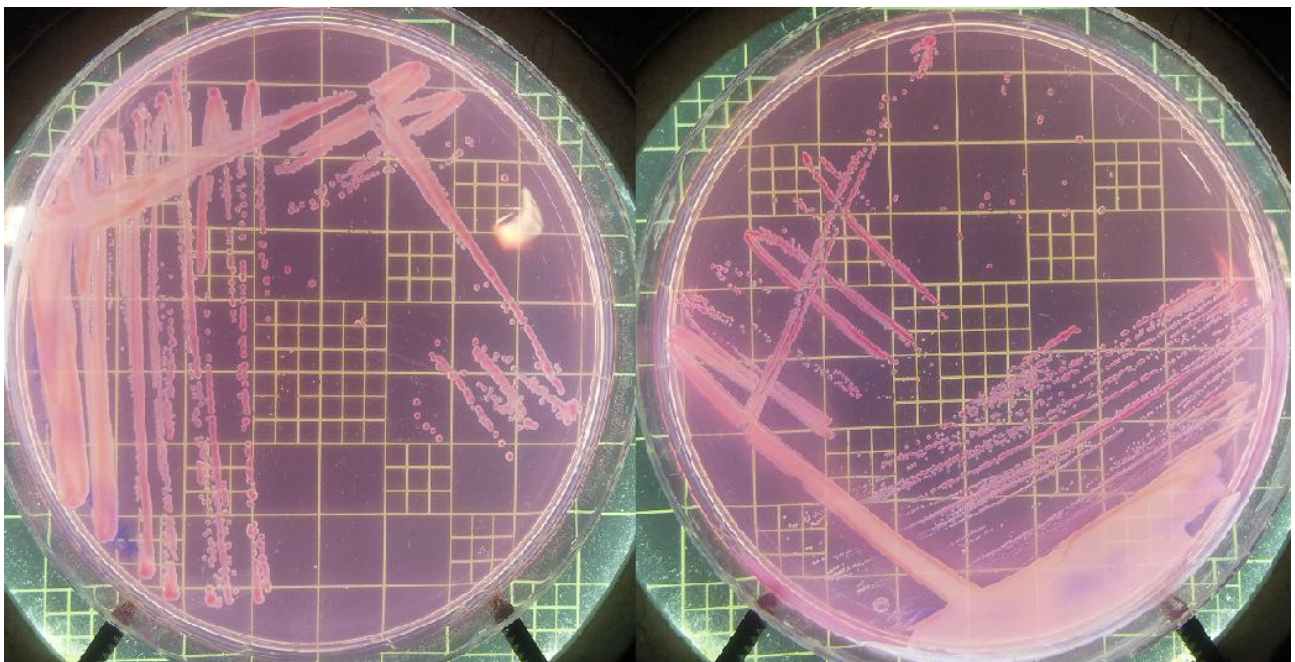
Taulukko 6. Tutkimuksessa käytetyt referenssikannat.

Kanta	Biotyyppi	Serotyyppi	Lähde	Eristysmaa	GenBank
Ye30-09	1A	O:5	Sianliha	Saksa	FR847859.1
8081	1B	O:8	Ihminen	USA	CP009846.1
SDWL-003	1A	O:3	Vuohi	Kiina	JX972143.1
NX1997-IE419	2	O:9	Jyrsijä	Kiina	GU722202
W22703	2	O:9	Ihminen	Belgia	FR718555.1
Y11	4	O:3	Ihminen	Saksa	FR729477.2

5. TULOKSET

5.1 Kasvu selektiivialustoilla

Kantojen kasvu kuvattiin CIN-maljalla noin 24 h kasvun jälkeen. Kannat kasvoivat CIN-maljalla *Yersinioille* tyypillisellä tavalla. Pesäkkeet olivat harmahtavan vaaleita reunoilta ja keskeltä punaisia. Ei-patogeenisille kannoille tyypillisesti värin vaihtuminen vaaleasta punaiseen oli utuinen. Pesäkemorfologialtaan kannat olivat samanlaisia, melko pyöreitä ja sileäreunaisia. Myöskään tuoksultaan kannat eivät eronneet toisistaan. Pesäkkeiden koossa oli hieman eroja. Suurin osa pesäkkeistä oli noin 1 – 1,5 mm halkaisijaltaan. Osa kannoista kasvoi kuitenkin todella pieninä, halkaisijaltaan noin 0,5 mm, pesäkkeinä. Kaikki *Y. kristenseniksi* osoittautuneet kannat kasvoivat pieninä pesäkkeinä. Kuvassa 2 on esitetty villisiasta eristetyn kannan WSTY 160 ja metsämyyrän suolesta eritetyn kannan MY M70 kasvu CIN-agarilla.



Kuva 2. Kantojen WSTY 160 (vasemmalla) ja MY M70 kasvu CIN-agarilla.

5.2. Bio- ja serotyyppityksen tulokset

Kaikkien 26 kannan laji määritettiin käyttäen API 20E:tä ja muita biotyyppitysreaktioita. Kannoista 22 oli *Y. enterocolitica* ja neljä ympäristölajia *Y. kristensenii*. Kuvassa 3 on esitetty kannan MY T19D1 (peräisin metsämyyrän kielestä) API 20E -testi. Sokeriputkien (salisiini, trehaloosi ja ksyloosi), tween-, eskuliini-, urea- ja pyratsinamidaasitestien perusteella kaikki *Y. enterocolitica* kannat olivat lähimpänä biotyyppiä 1A. Biotyyppin määrittämiseen tarvittava indolitestin tulos saatiin API 20E:stä. Kannoista vain kolme saatiin serotyyppitettyä, muiden serotyyppi ei ollut määritettävissä. Bio- ja serotyyppityksen tulokset on esitetty taulukossa 7.



Kuva 3. Kannan MY T19D1 API 20E-testi.

Taulukko 7. Bio- ja serotyypityksen tulokset.

Kanta	Lähde	API 20E	Laji	pyz ^a	esk ^b	tween ^c	sal ^d	xyl ^e	tre ^f	Biotyyppi	Serotyyppi
HKY 434	Kanan uloste	1314523	<i>Y. enterocolitica</i>	(+) ^g	+	-	+	+	+	1A	EM ^h
LAS 383	Lampaan uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
LAS 384	Lampaan uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
LAS 517	Lampaan uloste	5155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
PS 23	Salaattisekoitus	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	(+)	+	+	+	+	1A	O:5
WSTY 3	Villisian uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
WSTY 160	Villisian uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	(+)	+	1A	EM
PR 4	Peuran ruho	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
PR 18	Peuran ruho	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
PR 20	Peuran ruho	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
HR 88	Hirven ruho	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	(+)	+	+	+	1A	EM
SO 16	Sorsan uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	(+)	+	+	+	1A	EM
TA 27	Tavin uloste	1154723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	-	+	+	+	1A	O:8
MY A ₅ 18D3	Peltohiiren kieli	1145723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	(+)	+	+	+	1A	O:3
MY F ₅ 28D1	Metsähiiren suoli	1155523	<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-	+	+	+	1A	O:1/O:2
MY M ₂ 9A3	Peltomyyrän suoli	1155523	<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-	+	+	+	1A	EM
MY T19D1	Metsämyyrän kieli	1155523	<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-	(+)	+	+	1A	EM
LIP 5	Pulun uloste	1554523	<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-	+	+	+	1A	EM
YLI 63	Linnun uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
YLUU 186	Sian uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	+	+	+	1A	EM
IHI 111299	Ihmisen uloste	1155523	<i>Y. enterocolitica</i>	(+)	+	+	+	+	+	1A	EM
SWHY 82	Ihmisen uloste	1155723	<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	+	+	+	1A	EM
MY M ₂ 9A27	Peltomyyrän suoli	1155503	<i>Y. kristensenii</i>	+	+	-	+	+	+		
MY M34	Peltomyyrän suoli	1155503	<i>Y. kristensenii</i>	+	+	-	+	+	+		
MY M70	Metsämyyrän suoli	1154503	<i>Y. kristensenii</i>	(+)	-	(+)	-	+	+		
HR 100	Hirven ruho	1154503	<i>Y. kristensenii</i>	-	-	(+)	+	+	+		

pyz^a = pyratsinamidaasitestiesk^b = eskuliinitestitween^c = lipaasin käyttösal^d = salisiinitestixyl^e = ksyloositestitre^f = trehaloositesti(+) ^g = reaktio hidas tai heikkoEM^h = ei määritettävissä

5.3. Sekvensointitulokset

PCR-tuotteet lähetettiin sekvensoitavaksi Helsingin Biotekniikan instituuttiin. Tutkimuksessa mukana olleista 26 kannasta viisi jäi sekvensoinnista pois. Kantojen HKY 434 ja TA 27 PCR-tuotteen DNA-pitoisuus oli erittäin alhainen, mikä viittasi siihen, että niille ei olekaan *ail*-geeniä. Kantojen MY A₅18D3 ja PR 18 PCR-tuotteen DNA-pitoisuus oli alle sekvensointiin vaadittavan raja-arvon 20 ng/μl ja kannan YLI 63 geelielektroforeesissa esiintyi ylimääräisiä fragmentteja, minkä takia myös nämä jätettiin sekvensoinnista pois.

Kannat jakautuivat *ail*-geenin perusteella kahteen eri profiiliin. Profiilit erosivat toisistaan kahdella emäksellä. 451. emäs profiilissa 1 oli guaniini (G) ja profiilissa 2 adeniini (A). 481. emäs oli profiilissa 1 adeniini ja profiilissa 2 guaniini. Kantojen jakautuminen profiileihin on esitetty taulukossa 8. Profiilien 1 ja profiilin 2 sekvenssien ero on esitetty kuvassa 4 ja koko *ail*-geenin sekvenssi kummankin profiilin osalta 489 emäsparin pituudelta on esitetty liitteessä 2.

Taulokko 8. Sekvensointitulosten profiilit.

Profiili 1			Profiili 2		
Kanta	Laji	Lähde	Kanta	Laji	Lähde
LAS 383	Ye ^a	Lampaan uloste	MY F ₅ 28D1	Ye	Metsähiiren suoli
LAS 517	Ye	Lampaan uloste	MY M ₂ 9A27	Yk	Peltomyyrän suoli
LAS 384	Ye	Lampaan uloste	MY M ₂ 9A3	Ye	Peltomyyrän suoli
PR 4	Ye	Peuran ruho	MY M34	Yk	Peltomyyrän suoli
PR 20	Ye	Peuran ruho	MY T19D1	Ye	Metsämyyrän kieli
HR 88	Ye	Hirven ruho	LIP 5	Ye	Pulun uloste
HR 100	Yk ^b	Hirven ruho	IHI 111299	Ye	Ihmisen uloste
MY M70	Yk	Metsämyyrän suoli			
WSTY 3	Ye	Villisian uloste			
WSTY 160	Ye	Villisian uloste			
YLUU 186	Ye	Sian uloste			
PS 23	Ye	Salaattisekoitus			
SO 16	Ye	Sorsan uloste			
SWHY 82	Ye	Ihmisen uloste			

Ye^a = *Yersinia enterocolitica*

Yk^b = *Yersinia kristensenii*

	451	481
Profiili 1	GACGCTTCATATGAATACTCCAACTCGATAGCATAAAA	
Profiili 2	GACACTTCATATGAATACTCCAACTCGATAGCCTAAAA	

Kuva 4. Profiilien 1 ja 2 sekvenssien ero.

Tutkimuksen kantojen *ail*-geenejä verrattiin NCBI-tietokannasta valittujen referenssikantojen (taulukko 6) *ail*-geeneihin. Profiiliin 1, profiiliin 2 ja referenssikantojen kaikki eroavat emäkset on esitetty kuvassa 5. Fylogeneettinen puu tutkimuksen kantojen ja referenssikantojen suhteesta on esitetty kuvassa 6.

Kanta Ye30-09 on *Y. enterocolitica* biotyyppiä 1A ja serotyyppiä O:5 (Kraushaar ym. 2011). Profiili 1 oli täysin identtinen kannan Ye30-09 *ail*-geenin kanssa. Profiili 2 vastasi kannan Ye30-09 *ail*-geenin kanssa 99,6 %. Eroa oli siis kahdessa emäksessä (451 ja 481), jotka erottivat myös profiilit 1 ja 2 toisistaan.

Kanta 8081 on *Y. enterocolitica* korkeapatogeenista biotyyppiä 1B ja serotyyppiä O:8 (Johnson ym. 2015). Profiili 1 vastasi kannan 8081 *ail*-geeniin 99,4 %. Eroa oli vain kolmessa emäksessä. Profiili 2 vastasi kannan 8081 *ail*-geeniin 99,0 %. Viisi emästä erosi kannan 8081 sekvenssistä, joista kaksi oli mutaatiokohdat, jotka erosivat myös profiilista 1.

Kanta SDWL-003 on *Y. enterocolitica* biotyyppiä 1A ja serotyyppiä O:3 (Liang ym. 2014). Profiili 1 vastasi kannan SDWL-003 *ail*-geeniin 96,3 %. 18 emästä erosi kannan SDWL-003 sekvenssistä. Myös profiili 2 erosi kannan SDWL-003 sekvenssistä 18 emäksen kohdalla, joten vastaavuus oli 96,3 %. Kanta SDWL-003 vastasi 451. emäksen kohdalla profiilia 1 ja 481. emäksen kohdalla profiilia 2.

Kanta NX1997-IE419 on *Y. enterocolitica* biotyyppiä 2 ja serotyyppiä O:9 (Huang ym. 2010). Profiili 1 vastasi kannan NX1997-IE419 *ail*-geenistä 95,6 %. Eroa löytyi 20 emäksestä. Profiili 2 vastasi kannan NX1997-IE419 *ail*-geeniä 96,1 %. Eroa oli 19 emäksessä kannan NX1997-IE419 sekvenssiin verrattuna.

Kanta W22703 on myös *Y. enterocolitica* biotyyppiä 2 ja serotyyppiä O:9 (Fuchs ym. 2011). Profiili 1 vastasi kannan W22703 *ail*-geeniä 95,5 %. Eroa kannan W22703 sekvenssiin oli 17 emäksen kohdalla. Profiili 2 vastasi kannan W22703 *ail*-geeniä 96,3 %. Eroa kannan W22703 sekvenssin oli 18 emäksen kohdalla.

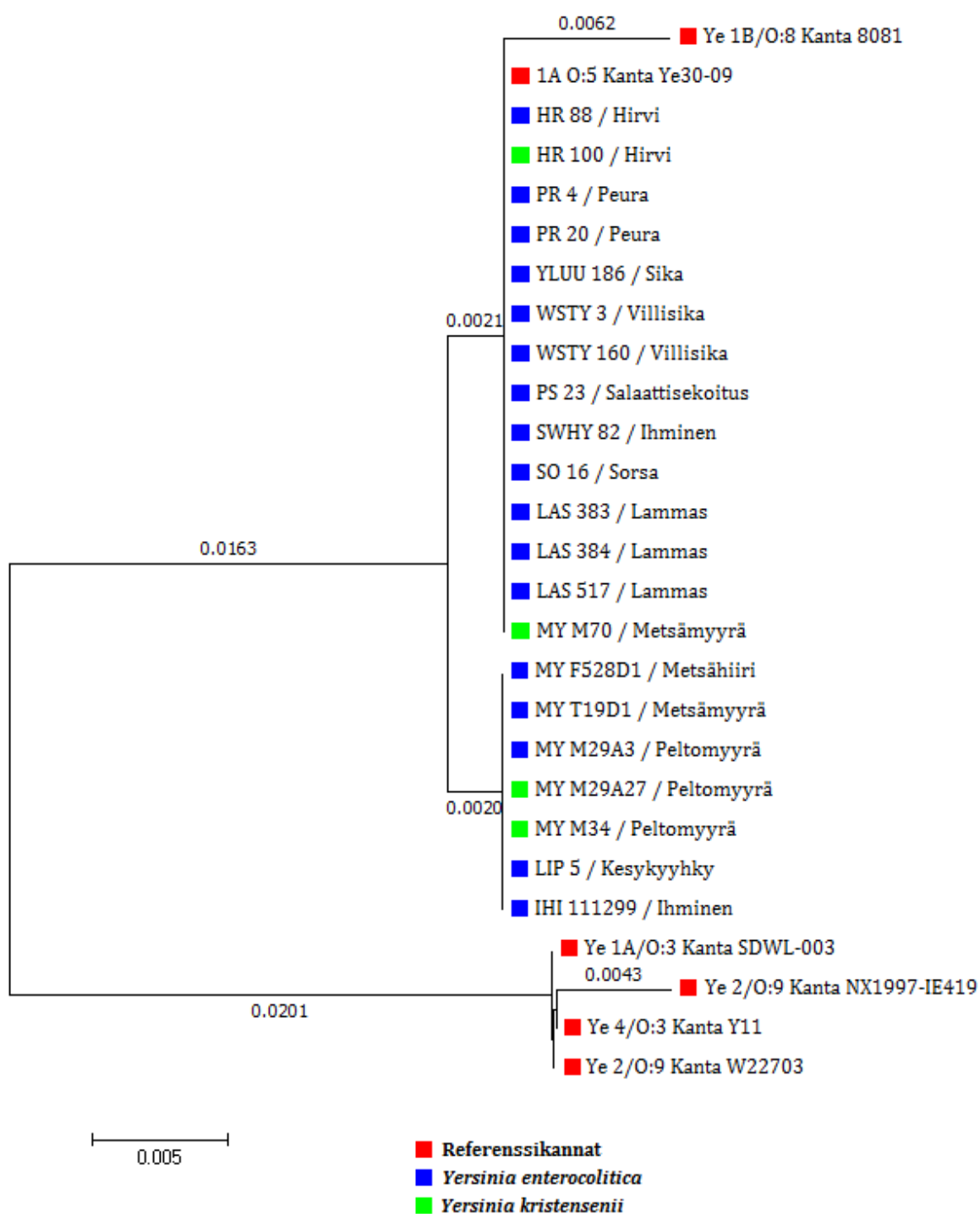
Kanta Y11 on *Y. enterocolitica* biotyyppiä 4 ja serotyyppiä O:3 (Batzilla ym. 2011). Bioserotyyppi 4/O:3 on yksi Euroopassa yleisimmin eristetyistä bioserotyypeistä (kirjassa

Carniel ym. 2006). Profiili 1 vastasi kannan Y11 *ail*-geeniin 96,3 %. Kannan Y11 sekvenssiin eroa löytyi 18 emäksestä. Profiili 2 vastasi kannan Y11 *ail*-geeniin myös 96,3 %. Eroa löytyi 18 emäksestä.

Tutkimuksen kantoja verrattiin myös Suomessa eristettyihin kahteen *ail*-positiiviseen *Y. enterocolitica*n biotyypin 1A kantaan (Sihvonen ym. 2011). Kannoista toinen oli peräisin ihmisten ulostenäytteestä (kanta FE81228). Kanta oli eristetty vuonna 2006 potilaasta, joka kärsi vatsakivuista ja ripulista. Potilalla ei ollut matkustelutaustaa (Sihvonen ym. 2009). Toinen *ail*-positiivinen kanta oli saatu Luonnonvarakeskukselta ja se oli eristetty porkkanasta (kanta FE94338). Sihvosen tutkimien kantojen *ail*-geenien sekvenssit olivat tämän tutkimuksen sekvenssejä lyhempiä eivätkä ne yltäneet mutaatiokohtiin (451. ja 481. emäs). Sihvosen kannat vastasivat tutkimuksen kantoja kuitenkin identtisesti 394 emäksen pituiselta alueelta.

		7	16	68	90	112	115	207	219	252	259	300
Profiili 1		A G C	T C T	A G T	C G C	T G T	G T A	A T C	A T G	A T G	T G T	T C A
Profiili 2		A G C	T C T	A G T	C G C	T G T	G T A	A T C	A T G	A T G	T G T	T C A
Ye30-09	(1A/O:5)	A G C	T C T	A G T	C G C	T G T	G T A	A T C	A T G	A T G	T G T	T C A
8081	(1B)	A G C	T C T	A G T	C G C	T G T	G G A	A T C	A T G	A T G	T G T	T C A
SDWL-003	(1A/O:3)	A A C	T T T	A A T	C A C	T G T	G T A	C C C	A C G	A C G	T C T	T T A
NX1997-IE419	(2/O:9)	A A C	T T T	A A T	C A C	T A G	G T A	C C C	A C G	A C G	T C T	T T A
W22703	(2/O:9)	A A C	T T T	A A T	C A C	T G T	G T A	C C C	A C G	A C G	T C T	T T A
Y11	(4/O:3)	A A C	T T T	A A T	C A C	T G T	G T A	C C C	A C G	A C G	T C T	T T A
		333	342	355	371	376	382	429	451	453	481	
Profiili 1		G G G	A T G	G T C	G A A	A A T	T G C	C A C	C G C	C T T	C A T	
Profiili 2		G G G	A T G	G T C	G A A	A A T	T G C	C A C	C A C	C T T	C G T	
Ye30-09		G G G	A T G	G G C	G A A	A A T	T G C	C A C	C G C	C T T	C A T	
8081		G G G	A T G	G T C	G A A	A A T	T G C	C A C	C G C	C T T	C A C	
SDWL-003		G T G	A C G	G T C	G G G	A G T	T A C	C G C	C G C	C T T	C G T	
NX1997-IE419		G T G	A C G	G T C	G G G	A G T	T A C	C G C	C G C	C G T	C G T	
W22703		G T G	A C G	G T C	G G G	A G T	T A C	C G C	C G C	C T T	C G T	
Y11		G T G	A C G	G T C	G G G	A G T	T A C	C G C	C G C	C T T	C G T	

Kuva 5. Profiilin 1, profiilin 2 ja referenssikantojen eroavaisuus *ail*-geenin suhteen.



Kuva 6. Fylogeneettinen puu tutkimuksen kantojen ja referenssikantojen *ail*-geeneistä.

6. POHDINTA

Sekä *Y. enterocolitica*n biotyyppejä 1A että ympäristölajia *Y. kristensenii* pidetään ei-patogeenisina, koska niiltä puuttuvat virulenssiplasmidi ja merkittävät kromosomaaliset virulenssitekijät. Molempia on kuitenkin eristetty satunnaisesti ihmisten ruoansulatuskanavasta sekä terveiltä että kliinisesti oireilevilta ihmisiltä (kirjassa Carniel ym. 2006).

ail-geenin on osoitettu osallistuvan monella tavalla patogeenisten *Yersinioiden* taudinaiheutukseen (Mikula ym. 2013). *Yersinioiden* patogeenisuus ei kuitenkaan riipu yksinään *ail*-geenistä vaan muitakin virulenssitekijöitä tarvitaan. *ail*-geenin ei ole osoitettu pystyvän aiheuttamaan infektiota ilman muita virulenssitekijöitä. Virulenssiplasmidia pidetään *Yersinian* tärkeimpänä virulenssitekijänä ja uskotaan, ettei infektiota synny ilman virulenssiplasmidia (Mikula ym. 2013).

ail-geeniä käytetään yleisesti laboratorioissa PCR-tutkimuksissa kohdegeeninä erottamaan patogeeniset kannat ei-patogeenisista (Kraushaar ym. 2011). Niin tämän kuin aikaisempienkin tutkimuksien perusteella voidaan kuitenkin sanoa, että *ail*-geeniä esiintyy satunnaisesti myös ei-patogeenisilla kannoilla (Cheyne ym. 2010, Kraushaar ym. 2011, Liang ym. 2014, Sihvonen ym. 2011, Zheng ym. 2008). Näin ollen *ail*-geeniin perustuva patogeenisten kantojen havaitseminen saattaa antaa virheellisiä positiivisia tuloksia. Patogeenisten kantojen tunnistamiseen olisi syytä käyttää jotain toista geeniä.

Tässä tutkimuksessa oli mukana melko suuri määrä *ail*-positiiviseksi todettuja, ei-patogeenisia *Yersinia*-kantoja. Ei-patogeenisten kantojen *ail*-geenejä on sekvensoitu melko vähän. NCBI-tietokannassa ei ole montaa *ail*-geeniä, joiden lähteeksi olisi ilmoitettu ei-patogeeninen *Yersinia*-kanta. Yllättävää oli, että kaikkien tutkimuksessa mukana olleiden kantojen *ail*-geenit olivat patogeenisista referenssikannoista lähimpänä *Y. enterocolitica*n korkeapatogeenisen biotyypin 1B kannan 8081 *ail*-geeniä. Tutkimuksessa mukana olleet kannat erosivat toisesta *Y. enterocolitica*n biotyypistä 1A olevasta referenssikannasta (SDWL-003) melko paljon (18/486 emästä olivat erilaiset) kun taas myös biotyypistä 1A olevaa kantaa Ye30-09 profiili 1 vastasi täydellisesti ja profiili 2 erosi vain kahden emäksen verran. Yllättävää oli myös, ettei ympäristölaji *Y. kristensenii*n kantojen *ail*-geeneissä ollut merkittäviä

eroja verrattuna *Y. enterocolitica* kantojen *ail*-geeneihin. Neljästä *Y. kristensenii* kannasta kaksi jakautui profiiliin 1 ja kaksi profiiliin 2. Tutkimuksessa oli mukana Sveitsissä eristetyt kannat villisioista ja ihmisestä. Sveitsiläisten kantojen *ail*-geenit eivät eronneet Suomessa eristettyjen kantojen *ail*-geeneistä. Kaikki sveitsiläiset kannat olivat *Y. enterocolitica* biotyyppiä 1A ja kannat jakautuivat *ail*-sekvenssin perusteella profiiliin 1. Tutkimuksen kannat oli eristetty useista hyvin erilaisista lähteistä. Tästä huolimatta kantojen *ail*-geenit olivat identtisiä tai erosivat toisistaan vain vähän. Sekvensointiin lähteneistä jyrksijäkannoista suurin osa (5/6) kuitenkin jakautuivat profiiliin 2. Näiden lisäksi profiiliin 2 jakautui kannat, jotka olivat peräisin ihmisestä ja kesykyyhkystä.

Usean tutkimuksessa mukana olleen *Y. enterocolitica* -kannan biotyyppitytulokset olivat epätyypillisiä biotyypille 1A. Varsinkin pyratsinamidaasi- ja tween-testeissä esiintyi negatiivisia ja heikkoja tai hitaita positiivisia tuloksia. Kyseisten kantojen biotyyppitys olisi ehkä syytä suorittaa uudestaan, jotta varmistuttaisiin niiden olevan biotyyppiä 1A, eikä patogeenista biotyyppiä. *Yersinioiden* biotyyppityksen haastavuuden takia voisi myös harkita muuta tunnistusmenetelmää, esimerkiksi kokogenomisekvenssointia.

Patogeenit kykenevät hankkimaan virulenssigeenejä horisontaalisen geenisiirtymän avulla sopeutuakseen ympäristön muutoksiin ja pärjätäkseen kilpailussa (Chan ym. 2011). Ei-patogeeniset isolaatit voivat saada virulenssigeenejä konjugaation avulla, jolloin patogeeninen kanta siirtää joko plasmidin tai kromosomin osan ei-patogeeniselle kannalle (Howard ym. 2006). On mahdollista, että *Y. enterocolitica* biotyypin 1A *ail*-positiiviset kannat ovat saaneet *ail*-geenin patogeenisilta kannoilta horisontaalisen geenisiirtymän avulla.

Ei-patogeenisten kantojen *ail*-geeneistä tarvitaan lisää tutkimusta. *ail*-positiivisilta kannoilta tulisi tutkia myös mahdollisia muita virulenssitekijöitä. *ail*-geenin toimivuudesta ei myöskään ole tietoa ei-patogeenisilla kannoilla ja siksi olisi syytä selvittää tuotetaanko *ail*-positiivisilla ei-patogeenisilla kannoilla *ail*-geenin koodaamaa toimivaa Ail-proteiinia bakteerin ulkokalvolle. Lisäksi voitaisiin harkita kokogenomisekvenssointia tai muuta tapaa, jolla saataisiin myös *ail*-geenin ympärillä olevat alueet sekvenssoitua.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessamme ei-patogeenisten *Y. enterocolitica* 1A- ja *Y. kristensenii* -kantojen *ail*-geenit jakautuivat kahteen sekvenssiprofiiliin (profiili 1 ja profiili 2). Sekvenssiprofiilit erosivat toisistaan vain kahden emäksen osalta (emäkset 451 ja 481). *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen ja *Y. kristensenii* kantojen *ail*-geenien välillä ei ollut eroa. Ei-patogeenisten *Yersinioiden* *ail*-geenit olivat lähes identtisiä Euroopassa eristettyihin *Y. enterocolitica* biotyypin 1A kantojen *ail*-geeneihin verrattuna. Ei-patogeenisten *Yersinia*-kantojen *ail*-geenit muistuttivat läheisesti korkeapatogeenisen biotyypin 1B *ail*-geeniä, mutta erosivat selvästi patogeenisten biotyyppien 2 ja 4 *ail*-geeneistä.

8. KIITOKSET

Haluaisin kiittää ohjaajaani Suvi Joutsenta kaikista neuvoista, kärsivällisyydestä ja joustavuudesta työtäni ohjatessa. Haluaisin myös kiittää työn johtajaa professori Maria Fredriksson-Ahomaata avusta, jota kesän aikana sain. Kiitos laboratoriohenkilökunnalle erityisesti Maria Starkille ja Kirsi Ristkarille kaikesta käytännön avusta. Kiitos myös Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolle kesäkoulun järjestämisestä ja mahdollisuudesta tutustua tieteelliseen tutkimukseen. Lopuksi kiitos kaikille muille kesäkoululaisille vertaistuesta. Kiitos erityisesti Anu Mäkelälle korvaamattomasta avusta laboratoriossa ja neuvoista kirjallisen työn suhteen.

9. LÄHTEET

Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999, 96: 14043-14048.

Ahmedy A, Vidon DJ, Delmas CL, Lett MC. Antimicrobial susceptibilities of food-isolated strains of *Yersinia enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, and *Y. kristensenii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1985, 28: 351-353.

Bartra SS, Ding Y, Fujimoto LM, Ring JG, Jain V, Ram S, Marassi FM, Plano GV. *Yersinia pestis* uses the Ail outer membrane protein to recruit vitronectin. Microbiology 2015, 161: 2174-2183.

Batzilla J, Hoper D, Antonenka U, Heesemann J, Rakin A. Complete genome sequence of *Yersinia enterocolitica* subsp. *polarctica* serogroup O:3. Journal of Bacteriology 2011, 193: 2067-10.

Bercovier H, Mollaret H, Alonso JM, Brault J, Fanning GR, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. Current Microbiology 1980, 4: 225-229.

Bercovier H, Ursing J, Brenner JD, Steigerwalt AG, Fanning GR, Carter GP, Mollaret H. *Yersinia kristensenii*: A new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose-negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Current Microbiology 1980, 4: 219-224.

Bhagat N, Viridi JS. The enigma of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A. Critical Reviews in Microbiology 2011, 37: 25-39.

Biedzka-Sarek M, Jarva H, Hyytiäinen H, Meri S, Skurnik M. Characterization of complement factor H binding to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infection and Immunity 2008, 76(9):4100-9.

Biedzka-Sarek M, Salmenlinna S, Gruber M, Lupas AN, Meri S, Skurnik M. Functional mapping of YadA- and Ail-mediated binding of human factor H to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infection and Immunity 2008, 76(11):5016-27.

Bliska JB, Falkow S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1992, 89: 3561-3565.

Bogdanovich T, Carniel E, Fukushima H, Skurnik M. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. Journal of Clinical Microbiology 2003, 41: 5103-5112.

Boyce JM, Evans EJ, Jr, Evans DG, DuPont HL. Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. Infection and Immunity 1979, 25: 532-537.

Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet DG, Daniel P. *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. Diseases of Aquatic Organisms 2014, 109: 117-126.

Carniel E, Autenrieth I, Cornelis G, Fukushima H, Guinet F, Isberg R, Pham J, Prentice M, Simonet M, Skurnik M, Wauters G. CHAPTER 3.3.13, *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. Teoksessa: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt (toim.) The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6. 3. p. Springer Science Business Media, LLC, Singapore 2006: 270 – 368.

Chan CX, Beiko RG, Ragan MA. Lateral transfer of genes and gene fragments in *Staphylococcus* extends beyond mobile elements. Journal of Bacteriology 2011, 193: 3964-3977.

Cheyne BM, Van Dyke MI, Anderson WB, Huck PM. The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. Journal of Water and Health 2010, 8: 487-499.

Cornelis GR. The *Yersinia* Ysc–Yop-Type III-weaponry. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2002, 3: 742-754.

Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Developmental Biology 2005, 278: 274-288.

Delmas CL, Vidon DJ. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from foods in France. Applied and Environmental Microbiology 1985, 50: 767-771.

Delor I, Kaeckenbeeck A, Wauters G, Cornelis GR. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infection and Immunity* 1990, 58: 2983-2988.

Desmaures N, Bazin F, Gueguen M. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* 1997, 83: 53-58.

Francino MP, Santos SR, Ochman H. Enterobacteriaceae: What's in a Name? Teoksessa: The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria Volume 6. 3. p. Springer, Singapore 2006: 50 – 54.

Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H. Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. *Journal of Medical Microbiology* 2006, 55: 747-749.

Fuchs TM, Brandt K, Starke M, Rattei T. Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O: 9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BioMed Central Genomics* 2011, 12: 1.

Fukushima H, Saito K, Tsubokura M, Otsuki K, Kawaoka Y. Isolation of *Yersinia* spp. from bovine feces. *Journal of Clinical Microbiology* 1983, 18: 981-982.

Grassl GA, Bohn E, Müller Y, Bühler OT, Autenrieth IB. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *International Journal of Medical Microbiology* 2003, 293: 41-54.

Howard SL, Gaunt MW, Hinds J, Witney AA, Stabler R, Wren BW. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 2006, 188: 3645-3653.

Huang Y, Wang X, Cui Z, Yang Y, Xiao Y, Tang L, Kan B, Xu J, Jing H. Possible use of *ail* and *foxA* polymorphisms for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *BioMed Central Microbiology* 2010, 10: 1.

Ibrahim A, Goebel B, Liesack W, Griffiths M, Stackebrandt E. The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 1993, 114: 173-177.

Inoue M, Nakashima H, Ueba O, Ishida T, Kobashi S, Takagi K, Nishu T, Tsubokura M. Community outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbiology and Immunology 1984, 28: 883-891.

Jalava K, Hakkinen M, Valkonen M, Nakari UM, Palo T, Hallanvuori S, Ollgren J, Siitonen A, Nuorti JP. An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*. The Journal of Infectious Diseases 2006, 194: 1209-1216.

Johnson SL, Daligault HE, Davenport KW, Jaissle J, Frey KG, Ladner JT, Broomall SM, Bishop-Lilly KA, Bruce DC, Coyne SR, Gibbons HS, Lo CC, Munk AC, Rosenzweig CN, Koroleva GI, Palacios GF, Redden CL, Xu Y, Minogue TD, Chain PS. Thirty-Two Complete Genome Assemblies of Nine *Yersinia* Species, Including *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*. Genome Announcements 2015, 3: (2):e00148-15.

Joutsen S, Eklund K, Laukkanen-Ninios R, Stephan R, Fredriksson-Ahomaa M. Sheep carrying pathogenic *Yersinia enterocolitica* bioserotypes 2/O: 9 and 5/O: 3 in the feces at slaughter. Veterinary Microbiology 2016, 197: 78-82.

Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom A, Skurnik M, Meri S. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. PLOS Pathogens 2008, 4(8):e1000140.

Kraushaar B, Dieckmann R, Wittwer M, Knabner D, Konietzny A, Made D, Strauch E. Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an *ail* gene. Journal of Applied Microbiology 2011, 111: 997-1005.

Le Guern A, Martin L, Savin C, Carniel E. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. International Journal of Infectious Diseases 2016, 46: 1-7.

Liang J, Bi Z, Shi G, Xiao Y, Qiu H, Kou Z, Hu B, Jing H, Wang X. Two novel *ail*-positive biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica* isolated in China with unequal adhesion and invasion properties. Infection, Genetics and Evolution 2014, 27: 83-88.

Liang J, Duan R, Xia S, Hao Q, Yang J, Xiao Y, Qiu H, Shi G, Wang S, Gu W, Wang C, Wang M, Tian K, Luo L, Yang M, Tian H, Wang J, Jing H, Wang X. Ecology and geographic distribution of *Yersinia enterocolitica* among livestock and wildlife in China. Veterinary Microbiology 2015, 178: 125-131.

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. Annual Reviews of Genomics and Human Genetics 2008, 9: 387-402.

Markey BK, Leonard FC, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Molecular techniques in diagnostic microbiology. Teoksessa: Elsevier Ltd Clinical veterinary microbiology. 2. p.

Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. Nature reviews genetics 2010, 11: 31-46.

Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. Genome Research 2005, 15: 1767-1776.

Mikula KM, Kolodziejczyk R, Goldman A. *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2013, 2: 169.

Miller VL, Beer KB, Heusipp G, Young BM, Wachtel MR. Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. Molecular Microbiology 2001, 41: 1053-1062.

Miller VL, Bliska JB, Falkow S. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* *ail* gene and characterization of the Ail protein product. Journal of Bacteriology 1990, 172: 1062-1069.

Miller VL, Falkow S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. Infection and Immunity 1988, 56: 1242-1248.

Miller VL, Farmer JJ 3rd, Hill WE, Falkow S. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. Infection and Immunity 1989, 57: 121-131.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 1990, 262: 56-61.

Neubauer H, Aleksic S, Hensel A, Finke E, Meyer H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. International Journal of Medical Microbiology 2000, 290: 61-64.

Nolte FS. Molecular Microbiology. Teoksessa: Manual of Clinical Microbiology Volume 1. 11. p. American Society for Microbiology, Washington 2015: 54 – 90.

Nuorti JP, Niskanen T, Hallanvuori S, Mikkola J, Kela E, Hatakka M, Fredriksson-Ahomaa M, Lyytikäinen O, Siitonen A, Korkeala H, Ruutu P. A widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *Journal of Infectious Diseases* 2004, 189: 766-774.

Petersen JM, Gladney LM, Schriefer ME. *Yersinia*. Teoksessa: *Manual of Clinical Microbiology* volume 1. 11.p. American Society of Microbiology, 2015: 738 – 751.

Pitkälä A, Virtanen T, Joutsen S, Leimi A, Tuominen P. *Yersinia enterocolitica* ja *Yersinia pseudotuberculosis* suomalaisissa elintarvikkeissa –riskiprofiili. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Eviran tutkimuksia 2/2009.

Pärn T, Hallanvuori S, Salminen S, Pihlajasaari A, Heikkinen S, Telkkinen H, Hakkinen M, Ollgren J, Huusko S, Rimhanen-Finne R. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 infection associated with raw milk consumption, Finland, spring 2014. *Eurosurveillance* 2015, 20(40):pii=30033

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Handbook. Pretreatment for Gram-Negative Bacteria ja Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol) (vaiheesta 2 alkaen). Qiagen 2006: 29 – 30, 40.

Revell PA, Miller VL. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 2001, 205: 159-164.

Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity* 1998, 66: 480-485.

Shayegani M, DeForge I, McGlynn DM, Root T. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal, and environmental sources. *Journal of Clinical Microbiology* 1981, 14: 304-312.

Sihvonen LM, Hallanvuori S, Haukka K, Skurnik M, Siitonen A. The *ail* gene is present in some *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 2011, 8: 455-457.

Sihvonen L, Haukka K, Kuusi M, Virtanen M, Siitonen A. *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like species in clinical stool specimens of humans: identification and prevalence of bio/serotypes in Finland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2009, 28: 757-765.

Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 2557-2564.

Tsang TM, Felek S, Krukons ES. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. Infection and Immunity 2010, 78: 3358-3368.

Zheng H, Sun Y, Mao Z, Jiang B. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology 2008, 53: 368-374.

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Tautien esiintyvyys 2015. *Yersinian* esiintyvyys 2015. <https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/seuranta-ja-epidemiati/tartuntatautirekisteri/tartuntataudit-suomessa-vuosiraportit/tautien-esiintyvyys-2015/yersinian-esiintyvyys-2015>,
Haettu 28.9.2016, päivitetty 3.5.2016.

Liite 1. Elatusaineiden valmistusohjeet.

TSA-agarin valmistusohje

TSA-agar

Tryptic Soy agar	40 g
H ₂ O	1000 lm

TSA-agar valmistettiin liuottamalla Tryptic Soy agar (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa) veteen ja autoklavoimalla agar 200 ml:n erissä 15 min 121 °C:ssa.

Naudanveriagarin valmistusohje

Naudanveriagar

Columbian Blood Agar Base No.2	44 g
H ₂ O	1000 ml
Naudanveri	50 ml

Naudanveriagar valmistettiin liuottamalla Columbian Blood Agar Base No.2 (Oxoid, Basingstoke, UK) veteen ja autoklavoimalla agaria 180 ml:n kokoisissa pulloissa 15 min 121 °C:ssa. Naudanveri sekoitettiin agariin ennen valamista maljoille.

CIN-agarin valmistusohje

Agarpohja

Yersinia selective agar base	29g
H ₂ O	500 ml

Antibioottilisä

Yersinia selective supplement	
H ₂ O - C ₂ H ₆ O (50:50)	2 ml

CIN-agar valmistettiin sekoittamalla Yersinia selective agar (Lab M, Lancashire, UK) veteen ja keitettiin kunnes jauhe oli liuennut. Tämän jälkeen agarpohjaa autoklavoitiin 15 min 121 °C:ssa. Ennen maljojen valamista agarpohjaan lisättiin Yersinia selective supplement-

antibioottilisä (Oxoid, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), joka oli sekoitettu 2 ml:aan vesi-etanoliseosta (50:50).

Sokeriliuosten valmistusohje

Sokerin kantaliuos

Bacto Neopeptone	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	1000 ml

0,32 % Bromtymolisiniliuos

Bromothymol blue	320 mg
H ₂ O - C ₂ H ₆ O (50:50)	
Yhteensä	100 ml

10 % Sokeriliuos

Sokeri (sal, tre, tai ksyl)	10 g
H ₂ O	100 ml

Valmis sokeriliuos

Sokerin kantaliuos	94 ml
0,32 % Bromtymolinsiniliuos	1 ml
10 % sokeriliuos	5 ml

Sokeriliuokset valmistettiin kolmessa eri vaiheessa. Sokerin kantaliuos valmistettiin sekoittamalla Bacto Neopeptone (BD, Le Pont de Claix, Ranska) ja NaCl veteen ja keitettiin kunnes jauheet liukenivat. Kantaliuos jaettiin 200 ml pulloihin ja autoklavoitiin 15 min 121 °C:ssa. Seuraavaksi valmistettiin 0,32 % bromtymolisiniliuos sekoittamalla Bromothymol blue (Merck, Darmstadt, Saksa) 50:50 vesi-etanoli seokseen, niin että lopputilavuudeksi tuli 100 ml. Kolmanneksi valmistettiin 10 % sokeriliuos sekoittamalla haluttu sokeri (Trehalose/D(+)-Xylose/Salicin, Merck, Darmstadt, Saksa) veteen, jonka jälkeen liuos steriilisuodatettiin. Varsinaiset sokeriputket valmistettiin sekoittamalla kolmea edellistä komponenttia (kantaliuos, 0,32 % bromtymolisiniliuos, 10 % sokeriliuos). Liuos steriilisuodatettiin ennen putkiin jakamista. Putkiin laitettiin liuosta noin 0.5 ml.

Tween 80-agarin valmistusohje

Tween 80-agar

Nutrient agar	28 g
H ₂ O	1000 ml
Tween 80	10 ml

Tween-agar valmistettiin sekoittamalla Nutrient agar (Oxoid, Hampshire, UK) veteen ja keittämällä liuosta 30 min, jonka jälkeen Tween 80 (Merck, Hohenbrunn, Saksa) lisättiin liuokseen ja keitettiin vielä 5 min. Agar autoklavoitiin 200 ml:n pulloissa 15 min 121 °C:ssa ennen maljojen valamista.

Eskuliiniagarin valmistusohje

Eskuliiniagar

Nutrient agar	28 g
Eskulin	1 g
H ₂ O	1000 ml

Eskuliiniagar valmistettiin liuottamalla Nutrient agar (Oxoid, Hampshire, UK) ja eskuliini (Merck, Darmstadt, Saksa) veteen. Agaria autoklavoitiin 200 ml:n pulloissa 15 min 121 °C:ssa.

Pyz-putkien valmistusohje

Tris-maleaattipuskuri

Trizma-maleaatti	31,52 g
H ₂ O	1000 ml

Pyz-agar

Tryptic soy agar	30,0 g
Yeast extract	3,0 g
Pyratsinkarboksamidi	1,0 g
Tris-maleaattipuskuri, 0,2 M, pH6	1000 ml

Pyz- eli pyratsinamidaasiputkien valmistus oli kaksivaiheinen. Ensin valmistettiin TRIS-maleaattipuskuri sekoittamalla Trizma-maleate (Sigma, Steinheim, Saksa) 500 ml:aan vettä, jonka jälkeen pH säädettiin NaOH:lla tai HCl:lla kuuteen. Oikean pH:n saavuttamisen jälkeen lisättiin vettä niin, että lopputilavuudeksi tuli 1000 ml. Pyz-agar valmistettiin liuottamalla Tryptic soy agar (Merck, Darmstadt, Saksa), Yeast extract (CONDA, Madrid, Espanja) ja Pyrazinecarboxamide (Sigma, Steinheim, Saksa) Tris-maleaattipuskuriin. Agarua autoklavoitiin 15 min 121 °C ennen putkien valamista. Agar valettiin vinopinnoiksi 10 ml:n koeputkiin noin 5 ml agarua putkea kohti.

Pyrasinamidaasitestin tulkintaan tarvittavan reagenssin valmistusohje

Ammoniumferro(II)sulfaatti-reagentti

Ammoniumferro(II)sulfaatti	0,014 g
H ₂ O	1 ml

Pyrasinamidaasitestin tulkintaa varten valmistettiin ammoniumferro(II)sulfaatti –reagenssi liuottamalla 0,014 g ammoniumferro(II)sulfaattia 1 ml:aan steriiliä vettä.

Ureaputkien valmistusohje

1,5 % vesiagar

European bacteriological agar	15 g
H ₂ O	1000 ml

20 % urealiuos

Difco Urea Agar Base	29 g
H ₂ O	100 ml

Ureaputket

1,5 % vesiagar	90 ml
20 % urealiuos	10 ml

Ureaputkien valmistus oli kaksivaiheinen. Ensin valmistettiin 1,5 % vesiagar liuottamalla European bacteriological agar (CONDA, Madrid, Espanja) veteen ja autoklavoimalla liuosta 90 ml:n annoksissa 15 min 121 °C:ssa. Seuraavaksi valmistettiin 20 % urealiuos liuottamalla Urea Agar Base (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) veteen, jonka jälkeen liuos steriilisuodatettiin. Urealiuos sekoitettiin 47–48 °C:een vesiagariin ja valettiin vinopinnoiksi 2 ml:n eppendorf-putkiin.

TSB-liuoksen valmistusohje

TSB-liemi

Tryptic Soy Broth	30 g
H ₂ O	1000 ml

TSB-liuos valmistettiin liuottamalla Tryptone Soy Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) veteen ja autoklavoimalla liuosta 150 ml:n erissä 15 min 121 °C:ssa.

Geelin valmistusohje elektroforeesia varten.

Reagenssi	40 ml geeli	200 ml geeli
SeaKem LE Agarose	0,4 g	2,0 g
25XTAE	1,6 ml	8,0 ml
H ₂ O	38,4 ml	192,0 ml
Etidiumbromidi	2 µl	10 µl

Elektroforeesigeeli valmistettiin liuottamalla SeaKem LE Agarose (Rockland, USA) 25XTAE-puskuriin (Amresco, Solon, USA) ja veteen. Seosta lämmitettiin, kunnes jauhe oli liuennut. Etidiumbromidi (MP Biomedicals, Illkirch, Ranska) lisättiin kun seos oli jäähtynyt noin 60 °C:een.

Liite 2. Profiilin 1 ja profiilin 2 *aif*-geenien sekvenssit (489 emäsparia). Emäket, jotka erottavat profiilit toisistaan, on merkitty violetilla ja vihreällä värillä. **G** = guaniini ja **A** = adeniini.

Profiilin 1 sekvenssi suuntaan 5' à 3'

TTACTAGCTAGTTCTCTAATAGCCTGTTTATCAATTGCGTCTGTTAATGTGTACGCTGCGAGTGAAA
GTAGTATTTCTATTGGTTATGCGCAAAGCCATGTAAAAGAAAATGGGTATACATTGGATAATGACC
CTAAAGGTTTTAACCTGAAGTACCGTTATGAACTCGATGATAACTGGGGAGTAATAGGTTTCGTTTG
CTTATACTCATCAGGGATATGATTTCTTCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCATGGTGATGTTGATT
ACTATTCAGTAACAATGGGGCCATCTTTCCGCATCAACGAATATGTTAGCCTTTATGGATTACTGGG
GGCCGCTCATGGAAAGGTTAAGTCATCTGTATTTGATGAATCAATCAGTGCAAGTAAGACGTCAAT
GGCATAACGGGGCAGGGGTGCAATTCAACCCACTTCCAAATTTTGTATTGAC**G**CTTCATATGAATAC
TCCAAACTCGATAGC**A**TAAAAGTT

Profiilin 2 sekvenssi suuntaan 5' à 3'

TTACTAGCTAGTTCTCTAATAGCCTGTTTATCAATTGCGTCTGTTAATGTGTACGCTGCGAGTGAAA
GTAGTATTTCTATTGGTTATGCGCAAAGCCATGTAAAAGAAAATGGGTATACATTGGATAATGACC
CTAAAGGTTTTAACCTGAAGTACCGTTATGAACTCGATGATAACTGGGGAGTAATAGGTTTCGTTTG
CTTATACTCATCAGGGATATGATTTCTTCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCATGGTGATGTTGATT
ACTATTCAGTAACAATGGGGCCATCTTTCCGCATCAACGAATATGTTAGCCTTTATGGATTACTGGG
GGCCGCTCATGGAAAGGTTAAGTCATCTGTATTTGATGAATCAATCAGTGCAAGTAAGACGTCAAT
GGCATAACGGGGCAGGGGTGCAATTCAACCCACTTCCAAATTTTGTATTGAC**A**CTTCATATGAATAC
TCCAAACTCGATAGC**G**TAAAAGTT